

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



ESTUDIO DE LAS ACCIONES DEL ÁCIDO RETINOICO
EN COMBINACIÓN CON EL INTERFERÓN- γ
O EL ÁCIDO POLIINOSÍNICO-POLICITIDÍLICO
EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA

TESIS DOCTORAL

ANA ROSA BERNARDO VILLADANGOS

Madrid, 2012

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



**Estudio de las acciones del ácido retinoico en combinación
con el interferón- γ o el ácido poliinosínico-policitidílico
en células de cáncer de mama**

Memoria que presenta

ANA ROSA BERNARDO VILLADANGOS

Licenciada en Biología, para optar al grado de Doctor por la
Universidad Autónoma de Madrid.

Directora de Tesis:

Dra. Ana María Jiménez Lara



Por la presente, **Dña. Ana María Jiménez Lara**, Doctora en Ciencias Biológicas e Investigador Contratado del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" de Madrid.

CERTIFICA: que **Dña. Ana Rosa Bernardo Villadangos**, Licenciada en Biología por la Universidad de León, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado:

"Estudio de las acciones del ácido retinoico en combinación con el interferón- γ o el ácido poliinosínico-policitidílico en células de cáncer de mama"

Considero que la presente Tesis Doctoral reúne todas las condiciones requeridas por la legislación vigente, así como la originalidad y calidad científica necesarias, para poder ser presentado y defendido con el fin de optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste a todos los efectos, firmamos el presente certificado para la autorización de la defensa de esta Tesis, en Madrid a 22 de Marzo de 2012.

Dra. Ana María Jiménez Lara

Directora de la Tesis
Investigador Contratado
CSIC

Vº Bº: Dra. Gema Moreno Bueno

Tutora de la Tesis
Profesor Titular
Universidad Autónoma de Madrid

Este trabajo ha sido financiado por las ayudas SAF2007-63634 y SAF2010-21195 del Ministerio de Ciencia e Innovación y por la ayuda 2005X0584 de la Fundación Médica Mutua Automovilística de Madrid, concedidas a Ana María Jiménez Lara, entre 2007 y 2011. Durante este período, Ana Rosa Bernardo Villadangos ha disfrutado de un contrato asociado a proyecto para la realización de esta Tesis Doctoral.

“El camino a todas las cosas grandes pasa por el silencio”

Friedrich Nietzsche

“La ciencia más útil es aquella cuyo fruto es el más compartido”

Leonardo Da Vinci

A mis padres

A mi hermano

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar he de agradecer al Ministerio de Ciencia e Innovación por financiar los proyectos de investigación que han apoyado la realización de este trabajo y el contrato que me ha permitido trabajar en la presente Tesis Doctoral.

Asimismo, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han estado a mi alrededor y me han apoyado durante todo este tiempo, y que directa o indirectamente, han contribuido a que esta Tesis Doctoral sea posible.

Agradezco a mi directora de Tesis la Dra. Ana María Jiménez Lara. Sin duda esta Tesis ha sido gracias a ti. Gracias por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio y guiarme durante estos años. Gracias por enseñarme a hacer lo que es Ciencia. Eres una gran científica y un referente para mí. Agradezco a la Dra. Ana Aranda, por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio, por su amabilidad y preocupación durante su desarrollo. También, agradezco a mi tutora, la Dra. Gema Moreno su amabilidad y cordialidad.

Agradezco a todos los compañeros de mi laboratorio 2.1 del IIB, porque todos habéis contribuido en mi formación científica y personal acompañándome durante esta etapa. Gracias por todas las horas de laboratorio que hemos compartido juntos y por haber hecho que haya sido un placer venir a trabajar cada día. Sois ya muchos los que habéis pasado por aquí, gracias a cada uno por haberme aportado algo enriquecedor. Gracias a todos, por estar siempre dispuestos a enseñar y ayudar, siempre con un buen gesto y una sonrisa. En especial agradezco a Ángeles Villaronga, Linn Market y Vero García, mis vecinas de poyata, por vuestra amistad, apoyo y sugerencias tanto dentro como fuera del IIB. También, agradezco a Lidia Ruiz, Alberto Zambrano, Mila Sánchez, Rosa Martín, Olaia Martínez y Constanza Contreras, por vuestras palabras amables, consejos y ayuda prestada. Asimismo, a Bea Gil, Aurora Sánchez y Marina Lasa por el ánimo y el interés mostrado.

A todos los compañeros con los que he compartido tantos momentos inolvidables en el IIB. Agradezco especialmente a Rafa Pérez, Eva Santos, Alejandra Morán, Mario Ituro, Cristina Moreno, Álvaro Macías, Antonio Herrador, Elena Izquierdo, Ana Filipa Pinto, Toño Barbáchano, Pepa Muñoz, Fábio Pereira, Daniela Livas, Paco Pérez, Raúl Jiménez, María Saiz, Marisol Avendaño, Javi Calvo y Carmen Hurtado. Gracias por hacer que me lleve tan buenos recuerdos. Un agradecimiento muy especial a Laura Gómez, por sus valiosas sugerencias en este trabajo y por todos los buenos momentos compartidos dentro y fuera del IIB.

Muy especialmente al Dr. Ángel Pascual por transmitirme su alegría y hacer que su laboratorio fuese mi segundo laboratorio. Asimismo, agradezco a Eva López y Kenny Moyna.

Muy sinceramente al Dr. José Miguel Cosgaya y la Dra. Josune Latasa por ser un ejemplo de dedicación y por los buenos consejos que me han hecho participe de su experiencia a nivel científico. Igualmente, agradezco el interés mostrado en el desarrollo de esta Tesis al Dr. Borja Belandia, la Dra. Carmen Valenzuela, el Dr. Alberto Muñoz, la Dra. Isabel Sánchez, el Dr. Oliver Vincent y la Dra. Noemí Cabrera. Asimismo, agradezco al Dr. Federico Ruiz por haber contribuido amablemente en la revisión de este trabajo.

A todo el personal de los diferentes servicios del IIB: Residuos y Prevención, Cultivos Celulares, Citometría, Microscopía, Cocina, Lavado de Material, Almacén, Informática, Imagen Científica y Biblioteca, así como Vigilancia y Recursos Humanos, por facilitarnos el trabajo cada día.

Agradezco al Dr. Luis F. García, por haberme inculcado en el apasionante mundo de la Ciencia durante mi estancia en PharmaMar y por sus valiosas sugerencias que hicieron que continuara en este camino. A todos mis compañeros del laboratorio de Biología Celular y MoA por sus consejos científicos y el interés mostrado, especialmente a Marta Martínez, Patri Martínez, Gema Santamaría, Beatriz de Castro, Sofia Cascajares, Guillermo Tarazona, Vicky Moneo y Juan F. Martínez, entre otros.

A todos mis amigos, que han mostrado su más sincera preocupación por este trabajo. Especialmente, a Cris Aguirre, Marta Sánchez, Fer Gonzalez, Marcos García, Elena Castro, Sandra Florensa, Cris Rubio, Sonia Matilla, Brenda Fernández, Mary García, Mayte Camino, Álex de la Puente, Mar Arias, Henar Hernando, Yoli Cortés, Toñi Cordero, Mamen Gutiérrez, María Rubio y Dani Arroyo.

Agradezco a mi familia que siempre me ha apoyado y aconsejado. A Dominica y Laura por sus buenos consejos para este trabajo. A Esther y María por su gran interés y fascinación por mi trabajo en el laboratorio. Muy especialmente a Jorge, gracias por esa alegría que me transmites y por tu fuerza, comprensión y ánimos. Quiero dedicar este trabajo a la memoria de Ángeles y de mis abuelos.

Agradezco de manera muy especial a mis padres Jenaro e Irene y a mi hermano Domingo, que siempre me han animado y ayudado en todos mis proyectos y emprendimientos para que sea feliz, y son los responsables de quién soy y de lo que he conseguido, además de un referente en mi vida.

Muchas Gracias.
Ana

RESUMEN

El ácido retinoico (AR), derivado de la vitamina A, regula importantes procesos celulares como el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia de células normales y tumorales. En general, el AR ejerce su acción a través de su unión a los receptores nucleares RAR y RXR, los cuales actúan como factores de transcripción dependientes de ligando, modulando la expresión de sus genes diana. El AR solo o en combinación con otros agentes ha demostrado una gran eficacia en el tratamiento de ciertos tipos de leucemias y tiene un enorme potencial en el tratamiento y la prevención de diversos tipos de cáncer, entre los que se incluye el cáncer de mama, debido principalmente a su habilidad para inhibir el crecimiento celular, promover la diferenciación e inducir en algunos casos la apoptosis. En la actualidad, existe un gran interés en desvelar el mecanismo molecular que subyace a la actividad antitumoral del AR, solo o en combinación con otros agentes con el fin de mejorar sus efectos terapéuticos.

Los resultados de este estudio sugieren que la inhibición de la proliferación por la acción del ácido 9-*cis* retinoico (9cRA) en combinación con el interferón- γ (IFN γ) se asocia con la inducción de la expresión de la proteína inhibidora de la apoptosis cIAP2 en diversos modelos celulares *in vitro* de cáncer de mama humano. Mediante experimentos de mapeo y de mutagénesis del promotor de cIAP2, se ha determinado que el 9cRA y el IFN γ inducen la expresión de cIAP2 a través de la interferencia o el "crosstalk" con NF-kappaB. En las células SK-BR-3, se ha descrito que el 9cRA y el IFN γ inducen la expresión de genes proapoptóticos como TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*), aunque la expresión de estos genes se asocia con una escasa inducción de la apoptosis. La expresión paralela de programas antiapoptóticos y en concreto de cIAP2, podría ser la causa de la escasa inducción de la apoptosis por parte del AR y el IFN γ en estos sistemas celulares; sin embargo, la depleción de cIAP2 mediante la transfección de un ARN interferente, no altera la sensibilidad de las células SK-BR-3 a los efectos proapoptogénicos del AR en combinación con el IFN γ . Nuestros resultados sugieren un papel para cIAP2 más complejo en la señalización mediada por el 9cRA en combinación con el IFN γ en las células SK-BR-3 del esperado inicialmente.

Por otra parte, la inhibición de la proliferación por la acción del 9cRA en combinación con el IFN γ se asocia con la inducción de la expresión del receptor tipo-Toll 3 (TLR3) en diversos sistemas celulares de cáncer de mama. Aún más importante, nuestros estudios revelan que el 9cRA, por sí solo, induce la expresión de TLR3 en células de cáncer de mama. TLR3 es un miembro de la familia de receptores TLR del sistema inmune innato que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos, y que recientemente ha sido reconocido como diana molecular para el tratamiento del cáncer, ya que es capaz de mediar la apoptosis en diferentes tipos de células tumorales. El ácido poliinosínico-policitidílico [poly(I:C)], un análogo sintético de ARN de cadena doble y un ligando para TLR3, es capaz de inducir la apoptosis en distintos tipos de células tumorales humanas y ha sido empleado como adyuvante en la terapia del cáncer. Los resultados de este estudio demuestran que la combinación del 9cRA con el poly(I:C) inhibe el crecimiento e induce la apoptosis en células de cáncer de mama de manera dependiente de TLR3 y del factor de transcripción IRF3. Además, en este proceso está involucrada la señalización autocrina de los interferones de tipo I, la activación de la caspasa-8 y la caspasa -3 y la expresión y la actividad del ligando de muerte TRAIL. Los resultados de este estudio señalan al 9cRA en combinación con el poly(I:C) como un potencial tratamiento del cáncer de mama y abogan por terapias combinadas basadas en el AR que actúen vía TRAIL para erradicar las células tumorales.

SUMMARY

Retinoic acid (RA), a derivative of vitamin A, regulates cellular processes such as growth, differentiation and survival of normal and cancer cells. RA exerts its actions through the binding to its cognate nuclear receptors, RAR and RXR, which act as ligand-dependent transcription factors that regulate the expression of their target genes. RA or RA-based therapies have shown efficacy in treating certain leukemias and have enormous potential on therapy and prevention of many types of cancer, including breast cancer, mainly due to RA ability to inhibit cell growth, to induce cancer cell differentiation and in some cases, to induce apoptosis. Currently, a great interest has developed in understanding the molecular mechanisms underlying the anticancer activity of RA in order to improve its therapeutic effects.

In this study, the results show that cell growth inhibition following treatment with 9-cis retinoic acid (9cRA) and interferon-gamma (IFN γ) associates to elevated expression of the inhibitor of apoptosis protein-2 (cIAP2) in different *in vitro* models of breast cancer cells. cIAP2 promoter mapping and cIAP2 promoter site-directed mutagenesis revealed that induction of cIAP2 expression by both 9cRA and IFN γ occurs through crosstalk with NF-kappaB. In SK-BR-3 cells, it has been described that 9cRA and IFN γ induce the expression of pro-apoptotic genes such as TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*), although the expression of these genes correlates with a weak induction of apoptosis by these agents. We hypothesize that parallel expression of anti-apoptotic programmes and specifically cIAP2 could account for the weak induction of apoptosis by 9cRA and IFN γ in these cell systems. However, knockdown of cIAP2 expression through interfering RNA transfection does not alter the sensitivity of SK-BR-3 cells to the pro-apoptogenic effects of 9cRA and IFN γ . These results suggest a more complex role of cIAP2 in 9cRA and IFN γ signaling in SK-BR-3 cells than initially expected.

On the other hand, inhibition of cell growth by 9cRA and IFN γ correlates with elevated expression of toll-like receptor 3 (TLR3) in breast cancer cell lines. Importantly, this study also shows that 9cRA, by itself, induces TLR3 expression in breast cancer cells. TLR3 is an innate immune receptor family member that recognizes pathogen associated molecular patterns, and has recently gained recognition as a novel molecular target for cancer therapy since it exerts a proapoptotic activity in some tumor cells. Polyinosinic-polycytidylic acid [poly(I:C)], a synthetic analogue of double-stranded RNA and a ligand for TLR3, can induce apoptosis in some human cancer cells and has been used as an adjuvant for cancer therapy. This study shows that combination of 9cRA and poly(I:C) synergistically inhibits growth and induces apoptosis of breast cancer cells in a TLR3- and IRF3- dependent manner, which involved type-I IFN autocrine signalling, caspase-8 and caspase-3 activation as well as the expression and activity of the tumor selective ligand TRAIL. These results highlight the combination approach of RA and poly(I:C) as a potential effective tumor therapy and argue for combination therapies based on RA that act via the TRAIL pathway to eradicate tumor cells.

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	7
1. La vitamina A y sus derivados los retinoides	9
1.1 Origen y función biológica de la vitamina A	9
1.2 Los retinoides: derivados activos de la vitamina A	9
1.3 Vitamina A y cáncer: primeras descripciones acerca de su potencial asociación	9
2. Los receptores de retinoides	10
2.1 Descripción de los receptores de retinoides	10
2.2 Señalización mediada por los receptores de retinoides.....	12
2.2.1 Regulación de la transcripción por el heterodímero RAR-RXR	12
2.2.2 Interferencia con otras vías de señalización	13
2.2.3 Efectos no genómicos del AR	14
3. Señalización por retinoides en cáncer	14
3.1 La leucemia aguda promielocítica: un ejemplo de asociación entre expresión aberrante de los receptores de ácido retinoico y el cáncer	15
3.2 Señalización por RAR alterada y silenciamiento de RAR β 2 en carcinomas	15
3.3 RARs interaccionan con la vía de señalización de los estrógenos en células de cáncer de mama	16
3.4 Retinoides y la terapia del cáncer	17
3.4.1 Retinoides en terapia	17
3.4.2 Retinoides en prevención	18
3.4.3 Retinoides en terapia combinada	19
4. Efectos antitumorales de los retinoides: efectos sobre la proliferación, la diferenciación celular y la apoptosis	20
4.1 Parada de la proliferación y diferenciación celular inducida por los retinoides	21
4.2 Apoptosis: modulación por los retinoides	21
4.2.1 Las caspasas como ejecutoras de la apoptosis	22
4.2.2 La vía apoptótica mitocondrial	22
4.2.3 La vía extrínseca de la apoptosis: el ligando de muerte TRAIL	23
4.2.4 Señalización apoptótica por receptores tipo-Toll 3	24

4.2.5	Proteínas reguladoras de la apoptosis: las proteínas FLIP y IAPs	26
4.2.6	Que mediadores de las vías proapoptóticas utiliza el AR para ejercer sus efectos	27
OBJETIVOS		29
MATERIALES Y MÉTODOS		33
1.	Reactivos	35
2.	Anticuerpos	35
3.	Cultivos celulares	36
4.	Ensayos de <i>Western Blot</i>	36
5.	Extracción de ARN total y PCR cuantitativa (qPCR)	37
6.	Construcciones de plásmidos	38
7.	Transfecciones celulares y ensayos de luciferasa	38
8.	Ensayos de silenciamiento génico mediante ARN de interferencia	39
9.	Ensayos de proliferación celular	39
10.	Ensayos de muerte celular	39
11.	Análisis estadístico	40
RESULTADOS		41
1.	Implicación del gen antiapoptótico cIAP2 en los efectos antiproliferativos inducidos por el 9cRA y el IFNγ en las células SK-BR-3	43
1.1.	El 9cRA, sólo o en combinación con el IFN γ , induce la expresión de cIAP2 a nivel de ARNm y de proteína	43
1.2.	Caracterización de los elementos de respuesta del promotor cIAP2 que median la activación transcripcional por el 9cRA e IFN γ en células de cáncer de mama SK-BR-3	45
1.3.	La depleción de cIAP2 no sensibiliza las células SK-BR-3 a la acción pro-apoptogénica del 9cRA en combinación con el IFN γ	47
2.	El AR y el TLR3: análisis de su interacción funcional en células de cáncer de mama	48
2.1.	El 9cRA sólo o en combinación con el IFN γ aumenta los niveles de ARNm y de proteína de TLR3	48
2.2.	El 9cRA regula la expresión de TLR3 de manera indirecta en las células SK-BR-3	51

2.3. El 9cRA y el poly(I:C), un ligando del receptor TLR3, cooperan para inhibir el crecimiento de células de cáncer de mama	52
2.4. El 9cRA y el poly(I:C) inducen la muerte de las células de cáncer de mama	54
2.5. El 9cRA y el poly(I:C) cooperan para inducir la expresión de los "sensores" de <i>dsRNA</i> : el receptor tipo-Toll 3, TLR3, las helicasas citosólicas RIG-1 y MDA-5, y la quinasa PKR en las líneas celulares de cáncer de mama SK-BR-3 y ZR-75-1	56
2.6. La apoptosis inducida por el 9cRA y el poly(I:C) se asocia con la activación de IRF3 y de NF- κ B en la línea celular SK-BR-3	57
2.7. La apoptosis inducida por el 9cRA en combinación con el poly(I:C) en la línea celular SK-BR-3 requiere la señalización por los interferones de tipo I	59
2.8. El 9cRA y el poly(I:C) inducen sinérgicamente la expresión del ligando de muerte TRAIL en la línea celular de cáncer de mama SK-BR-3	60
2.9. La inducción de la apoptosis por el tratamiento combinado con el 9cRA y el poly(I:C) es dependiente de TLR3 en las células SK-BR-3	61
2.10. La inducción de la apoptosis por el tratamiento combinado con el 9cRA y el poly(I:C) es dependiente de IRF3	62
2.11. La inhibición de TRAIL suprime parcialmente la muerte inducida por el tratamiento combinado con el 9cRA y el poly(I:C) en las células de cáncer de mama SK-BR-3	63
DISCUSIÓN	65
1. Inducción de programas antiapoptóticos por el AR y el IFN γ en las células de cáncer de mama: regulación transcripcional de cIAP2 por el AR y el IFN γ	69
2. Regulación de la expresión de TLR3 por el AR solo o en combinación con el IFN γ en células de cáncer de mama	71
3. Inducción de la apoptosis por el AR y el poly(I:C) en las células de cáncer de mama	72
4. Participación de los IFNs de tipo I en la apoptosis inducida por el AR y el poly(I:C)	75
5. Regulación de la expresión de TRAIL por AR en combinación con el poly(I:C) en las células de cáncer de mama	76
6. TRAIL participa en la muerte celular inducida por el AR en combinación con el poly(I:C) en células de cáncer de mama	77
CONCLUSIONES	79
BIBLIOGRAFÍA	83

13cRA: Ácido 13 <i>cis</i> -retinoico	CARDIF: <i>CARD</i> Adapter Inducing Interferon-beta
2'-5'-OAS: 2'-5'-Oligoadenilato sintetasa	CBP: Proteína de unión a CREB (<i>CREB-Binding Protein</i>)
4-HRP: 4-hydroxy-phenylretinamide (Fenretinida)	CD95: <i>Cluster of Differentiation 95</i> (FAS receptor)
9cRA: Ácido 9 <i>cis</i> -retinoico	CDKs: Quinasas dependientes de ciclina (<i>Cyclin-Dependent Kinases</i>)
ADN : Acido desoxirribonucleico	cFLIP: <i>Cellular FLICE Inhibitory Protein</i>
ADNc: ADN de cadena sencilla	CHX: Cicloheximida
AF-1: Dominio de activación-1 o independiente de ligando (<i>Activation Function-1</i>)	ciAP1: Proteína inhibidora de apoptosis-1 (<i>Inhibitor of Apoptosis Protein-1</i>)
AF-2: Dominio de activación-2 o dependiente de ligando (<i>Activation Function-2</i>)	ciAP2: Proteína inhibidora de apoptosis-2 (<i>Inhibitor of Apoptosis Protein-2</i>)
AIF: Factor inductor de apoptosis (<i>Apoptosis Inducing Factor</i>)	CMV: Citomegalovirus
AML: Leucemia mieloide aguda (<i>Acute Myeloid Leukemia</i>)	CoA: Coactivadores
AP-1: Proteína activadora-1 (<i>Activator Protein-1</i>)	CRABP: Proteína celular de unión a ácido retinoico (<i>Cellular Retinoic Acid-Binding Protein</i>)
Apaf-1: Factor activador de la proteasa apoptótica-1 (<i>Apoptosis Protease-Activating Factor-1</i>)	CREB: Factor de unión a los elementos de respuesta a AMPc
APL: Leucemia promielocítica aguda (<i>Acute Promyelocytic Leukemia</i>)	CRPB: Proteína celular de unión a retinol (<i>Cellular Retinol-Binding Protein</i>)
Apo2L: <i>Apoptosis-inducing ligand 2</i>	Ct: Ciclo umbral (<i>Threshold cycle</i>)
AR: Ácido retinoico	CYP26A1: <i>Cytochrome P450 26A1</i> (Enzima de la superfamilia del citocromo P450 con actividad hidroxilasa del ácido retinoico)
ARNm: ARN mensajero	DBD : Dominio de unión al ADN (<i>DNA-Binding Domain</i>)
ARNr: ARN ribosómico	DD: Dominio de muerte (<i>Death Domain</i>)
ATCC: <i>American Type Culture Collection</i>	DED: Dominio efector de muerte (<i>Death Effector Domain</i>)
ATP: Adenosín 5'-trifosfato	DISC: Complejo señalizador inductor de la muerte celular (<i>Death Inducing Signalling Complex</i>)
atRA: Ácido retinoico <i>todo-trans</i> (<i>All-trans Retinoic Acid</i>)	DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
Bcl-2 : <i>B-cell leukemia/lymphoma-2</i>	DMSO: Dimetilsulfóxido
BIR: <i>Baculoviral IAP Repeat</i>	DNMT: ADN metiltransferasa
CAD: ADNasa activada por caspasas (<i>Caspase Activated DNase</i>)	DR4: <i>Death Receptor-4</i>
CAR : Receptor Constitutivo del Androstano (<i>Constitutive Androstane Receptor</i>)	DR5: <i>Death Receptor-5</i>
CARD: Dominio reclutador de caspasas (<i>Caspase Recruitment Domain</i>)	

dsRNA: ARN de doble cadena (*double-stranded RNA*)

DTT: Ditioneitol

ECL: Reactivo quimioluminiscente (*Enhanced chemiluminescence*)

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial (*Endothelial NO Synthase*)

ER α : Receptor de estrógenos

FADD: Dominio de muerte asociado a FAS (*FAS-Associated Death Domain*)

FasL: Ligando de FAS

FBS: Suero fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*)

FLIPL: *Cellular FLICE Inhibitory Proteins long form*

FLIPs: *Cellular FLICE Inhibitory Protein short form*

FXR: Receptor X de Farnesoides (*Farnesoid X Receptor*)

Gln: L-glutamina

GPCRs: Receptores acoplados a proteínas G

GR: Receptor de glucocorticoides

GRE: Elemento de respuesta a glucocorticoides (*Glucocorticoid Response Element*)

HAT: Acetiltransferasa de histonas

HDAC: Desacetilasa de histonas

HRE: Elementos de respuesta a hormonas

IBM: Motivo de unión a IAP (*IAP-Binding Motif*)

ICAD: Inhibidor de la activación de CAD

IFIH1: *Interferon Induced with Helicase C Domain 1 Protein*

IFN: Interferón

IFNGR: Receptor de interferón-gamma

IFNR1: Receptor de interferón de tipo I (*Interferon Receptor 1*)

IgG: Inmunoglobulina G

IL: Interleuquina

IP: Ioduro de propidio

IPS-1: *IFN- β Promoter Stimulator-1*

IRF: Factor regulado por interferones (*Interferon Regulatory Factor*)

IRF-E: *Interferon Regulatory Factor- Enhancer*

ISGF3: *IFN-Stimulated Gene Factor-3*

ISGs: Genes inducidos por interferones (*IFN Stimulated Genes*)

I κ B: Inhibidor específico de NF- κ B (*Inhibitor of the NF-kappa B*)

JNK: *c-Jun N-terminal kinase*

Kb : kilobases

LBD: Dominio de unión al ligando (*Ligand- Binding Domain*)

LRR: Repeticiones ricas en leucina (*Leucine Rich Domain*)

LUBAC: *Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex*

Luc: Luciferasa

LXR: Receptor X hepático (*Liver X Receptor*)

MAPK: Proteína kinasa activada por mitógenos (*Mitogen-Activated Protein Kinases*)

MAVS: *Mitochondria Antiviral Signaling Protein*

MDA-5: *Melanoma-Associated Differentiation Gene-5*

n.sp.: Señal no específica

NFAT: Factor nuclear de células-T activadas (*Nuclear Factor of Activated T-cells*)

NF- κ B: Factor nuclear-kappa B (*Nuclear Factor-kappa B*)

NGFI-B: *Nerve Growth Factor Inducible B*

NK: Células Natural Killer

NR: Receptores nucleares (*Nuclear Receptors*)

NT: No Tratadas

OMI/HtrA2: *OMI/ HtrA2 (High temperature requirement protein A2) family serin protease*

p65: Subunidad p65 de NF-κB

PAPMs: Patrones moleculares asociados a patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*)

PARP: Poli-ADP-Ribosa Polimerasa

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PKA: Proteína kinasa A (*Protein kinase A*)

PKB: Proteína kinasa B (*Protein kinase B*)

PKC: Proteína kinasa C (*Protein kinase C*)

PKR: *interferon induced, dsRNA-activated Protein Kinase*

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

poly(A:U) : Ácido poliadenílico-poliuridílico

poly(I:C) : Ácido poliiinosínico-policitidílico

PPAR: *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*

PTEN: *Phosphatase and Tensin Homolog*

PXR: Receptor X de pregnanos (*Pregnane X Receptor*)

qPCR: PCR cuantitativa

RALDH: Enzima retinaldehído deshidrogenasa

RANTES: *Regulated Upon Activation, Normal T Cell Expressed And Secreted* (ccl-5)

RAR: Receptor de ácido retinoico

RARE: Elementos de respuesta de ácido retinoico

Rb: Proteína de retinoblastoma (*Retinoblastoma Protein*)

RBL1: *Retinoblastoma-Like Protein-1*

RHIM: *RIP Homotypic Interaction Motif*

RIG-1: *Retinoic Acid- Inducible Gene 1*

RIP1: *Receptor Interacting Protein-1*

RNasa: Ribonucleasa

RPB: proteína de unión al retinol (*Retinol-Binding Protein*)

RT: Retrotranscripción

RXR: Receptor del retinoide X

SD: Desviación estándar

SDS: Dodecil sulfato de sodio

siRNA: ARN interferente pequeño (*small interfering RNA*)

SMAC/DIABLO: *Second mitochondria-derived activator of caspase, Smac protein, Direct IAP-binding protein with low pI*

SMCC: *SRB/MED-containing cofactor complex*

SMRT: *Silencing Mediator for retinoic Acid Receptor and Thyroid hormone receptor*

STAT: *Signal Transducer and Activator of Transcription*

STRAT6: Receptor inducido por ácido retinoico 6 (*Stimulated by Retinoic Acid 6*)

tBid: Proteína Bid truncada

TGF-β: Factor de crecimiento transformante-β

T_H1: Células T colaboradoras tipo1

TLR: Receptor tipo-Toll (*Toll-like Receptor*)

TLR3: Receptor tipo-Toll 3 (*Toll-like Receptor 3*)

TNF: Factor de necrosis tumoral (*Tumor Necrosis Factor*)

TNF-R: Receptor del factor de necrosis tumoral (*Tumor Necrosis Factor Receptor*)

TNFSF10: *Tumor Necrosis Factor (ligand) Superfamily, member 10*

TR: Receptor de hormonas tiroideas

TR3: Receptor nuclear huérfano TR3 (*Testicular Receptor 3*)

TRADD: Proteína adaptadora con DD asociada a TNFR1 (*Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated Death Domain protein*)

TRAF: Factor asociado al receptor TNF (*TNF Receptor-Associated Factor*)

TRAIL: Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (*Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis- Inducing Ligand*)

TRAIL-R1: Receptor-1 de **TRAIL**

TRAIL-R2: Receptor-2 de **TRAIL**

TRAP: Proteína asociada al Receptor de Hormona Tiroidea
(*Thyroid-hormone-**R**eceptor **A**ssociated **P**rotein*)

TRIF: Adaptador con dominio TIR inductor del IFN- β (***TIR**
Domain-Containing Adaptor-Inducing Interferon- β*)

TTNPB: 4-(2-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-
naphthalenyl)-1-propenyl)benzoic acid (Pan-
agonista de RAR)

TTR: Transtirretina

V_{DR}: Receptor de vitamina D

VISA: *Virus- Induced- Signaling **A**dapter*

W_B: *Western **B**lot*

wt: wild-type

1. La vitamina A y sus derivados los retinoides

1.1 Origen y función biológica de la vitamina A

El descubrimiento de la vitamina A data de 1913, cuando E. Mc Collum y M. Davis, independientemente de L. Mendel y T. Osborne, observaron que ciertos animales de laboratorio no podían desarrollarse de forma normal con una dieta purificada de proteínas, hidratos de carbono, grasas y minerales, al menos que esta se complementara con mantequilla o extracto de yema de huevo. Dedujeron entonces que estas sustancias contenían un factor indispensable para el crecimiento y el desarrollo normal, al que denominaron *factor liposoluble A* y más tarde renombraron como vitamina A (Lanska, 2009). Durante los años veinte, se estableció la importancia de su papel biológico. Más tarde, se demostró la conversión de β -caroteno en vitamina A y se estableció entonces el papel de ciertos carotenoides como provitaminas A. Posteriormente, se propusieron las fórmulas estructurales de ambos compuestos. En 1947 se sintetizó por primera vez la vitamina A en forma pura cristalina, mientras que el β -caroteno fue sintetizado en 1950.

La vitamina A y sus derivados metabólicos son necesarios para numerosas funciones biológicas tanto en la vida prenatal como postnatal (Kastner *et al.*, 1996; Niederreither *et al.*, 1999). Una carencia en vitamina A puede llevar a la muerte de un individuo adulto y a la interrupción del desarrollo embrionario. Del mismo modo el aporte de vitamina A debe ser regulado durante la embriogénesis: una deficiencia en vitamina A causa malformaciones severas en prácticamente todos los órganos mientras que un exceso tiene efectos teratogénicos. Igualmente, a lo largo del desarrollo postnatal, la vitamina A es indispensable para la supervivencia, el crecimiento, la reproducción, la visión y el mantenimiento de numerosos tejidos y órganos (revisado en (Kastner *et al.*, 1995)). Además, la vitamina A está implicada en el desarrollo y la diferenciación del sistema nervioso (Hunter *et al.*, 1991; Sucov and Evans, 1995) y recientemente, se la ha relacionado con la prevención y el tratamiento del cáncer entre otras enfermedades (Goodman, 1984).

1.2 Los retinoides: derivados activos de la vitamina A

Los compuestos estructural y funcionalmente derivados de la vitamina A o retinol, de origen natural y sintético, se incluyen en la denominación genérica de retinoides. Los animales no son capaces de sintetizar la vitamina A y por tanto debe ser incorporada en la alimentación en forma de carotenos de origen vegetal o ésteres de retinol de origen animal, para después ser transformada mediante reacciones enzimáticas sucesivas en metabolitos como el ácido retinoico (AR). Una pequeña proporción de retinol presente en el plasma y los tejidos es convertido en el ácido retinoico todo-*trans* (atRA), el principal derivado activo de la vitamina A (Figura 1). Otros metabolitos, como el ácido 9-*cis* retinoico (9cRA) y el ácido 13-*cis* retinoico (13cRA) poseen igualmente una actividad señalizadora.

1.3 Vitamina A y cáncer: primeras descripciones acerca de su potencial asociación

En 1925, se estableció por primera vez la correlación entre la deficiencia en vitamina A y el desarrollo del cáncer, demostrando que la deficiencia en vitamina A tenía efectos sobre la proliferación y la diferenciación de células epiteliales (Wolbach and Howe, 1925). En los años 50-60, se demostró que una deficiencia en vitamina A aumentaba el número de tumores espontáneos o inducidos químicamente en animales de experimentación (Lasnitzki, 1955; Saffiotti *et al.*, 1967) y que además, dicho fenómeno era contrarrestado por la adición de dosis farmacológicas de vitamina A en la dieta (Bollag, 1972; Harisiadis *et al.*, 1978). Por otra parte, estudios epidemiológicos han demostrado que individuos con una dieta pobre

en vitamina A poseen un mayor riesgo de desarrollar cáncer (Sporn *et al.*, 1994). Estas observaciones han llevado a la hipótesis de que los niveles fisiológicos de vitamina A preservan al organismo frente al desarrollo de lesiones premalignas y malignas. Posteriormente, Lotan *et al.* así como otros grupos demostraron que la proliferación de un gran número de células cultivadas *in vitro* era inhibida por la adición de AR en el medio de cultivo (Chomienne *et al.*, 1986; Fraker *et al.*, 1984; Ludwig *et al.*, 1980; Sidell, 1982). Todos estos datos experimentales han conducido a la utilización de los retinoides en ensayos clínicos y al éxito en los primeros ensayos terapéuticos en la leucemia aguda promielocítica (APL) (Huang *et al.*, 1988) y más tarde a la utilización del AR en la terapia estándar de la APL (Sun *et al.*, 1999).

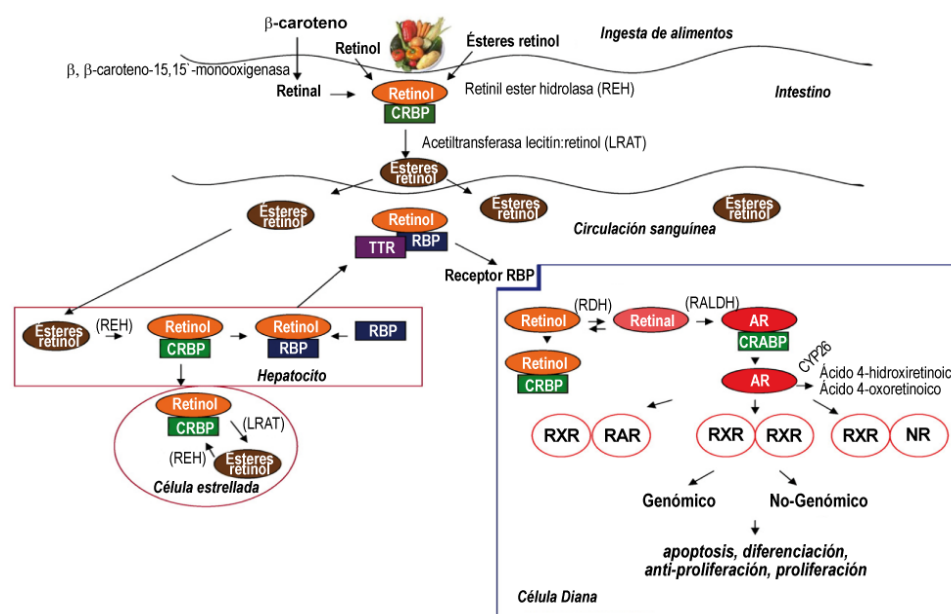


Figura 1. Biosíntesis del ácido retinoico en mamíferos. Las principales fuentes de vitamina A en la dieta son los carotenos de origen vegetal y los ésteres de retinol de origen animal. Mientras que el β -caroteno es absorbido directamente por los enterocitos por difusión pasiva convirtiéndose en retinol, los ésteres de retinol y el retinol procedentes de la dieta tienen que ser emulsionados con sales biliares y ácidos grasos para su absorción. En el enterocito, los retinoides absorbidos se unen a proteínas celulares de unión a retinol (CRBP) para ser convertidos en ésteres de retinol y entran en el torrente sanguíneo. El hígado capta los ésteres de retinol que son convertidos a complejos retinol-RBP (*Retinol Binding Protein*) en el hepatocito. En el suero, los complejos retinol-RBP se unen a la transtirretina (TTR) para prevenir la eliminación del retinol por el riñón y asegurarse que el retinol es captado por la célula diana. Alternativamente, los complejos retinol-RBP son almacenados en forma de ésteres de retinol en las células estrelladas del hígado. La entrada del retinol en la célula diana tiene lugar a través del receptor de RBP denominado STRA6 (*Stimulated by Retinoic Acid 6*). En la célula diana el retinol puede unirse a CRBP o ser oxidado a retinal en una reacción reversible por la retinol deshidrogenasa (RDH). Entonces, el retinal puede ser oxidado a ácido retinoico (AR) en una etapa irreversible y restringida a ciertos tejidos que expresan la enzima retinaldehído deshidrogenasa (RALDH). El AR puede unirse a CRABP (*Cellular Retinoic Acid Binding Protein*) o entrar en el núcleo e interactuar con sus receptores nucleares RAR y RXR para regular la transcripción de sus genes diana. Alternativamente, el AR puede ejercer su función en la célula mediante mecanismos no genómicos. La respuesta celular al ácido retinoico puede estar regulada a varios niveles, como la incorporación de retinol de la sangre, la participación de enzimas que convierten retinol en ácido retinoico y la presencia de reguladores y represores que interactúan con RAR y RXR. RAR, receptor del ácido retinoico; RXR, receptor del retinoide X; NR, receptor nuclear. (Adaptado de (Bushue and Wan, 2010)).

2. Los receptores de retinoides

2.1 Descripción de los receptores de retinoides

Los retinoides ejercen un papel fundamental en el desarrollo normal y tumoral. La mayor parte de los efectos inducidos por el AR se deben a su capacidad de modular la expresión génica. El clonaje en 1987 por los grupos de Pierre Chambon y Ron Evans, de los genes que codifican por los receptores nucleares del AR (RAR) supuso un gran avance en la dilucidación de la complejidad de la señal que transmite el AR (Giguere *et al.*, 1987; Petkovich *et al.*, 1987). El clonaje de los genes que codifican por los receptores del retinoide X (RXR), segunda de las subfamilias de los receptores del AR, tuvo lugar entre 1989-90 (Hamada *et al.*, 1989; Leid *et al.*, 1992; Mangelsdorf *et al.*, 1990).

El ácido atRA es el ligando fisiológico de los RARs pero es incapaz de unirse a los RXRs. El ácido 9cRA es capaz de unirse y activar tanto RAR como RXR *in vitro* (Mangelsdorf *et al.*, 1992). El término rexinoide aparece para definir los ligandos selectivos de RXR. La existencia y la identidad de los ligandos naturales de RXR es un tema de gran controversia. Se ha demostrado utilizando ratones y embriones de *Xenopus laevis* transgénicos para un gen reportero que RXR es activado *in vivo* (Luria and Furlow, 2004; Solomin *et al.*, 1998). Por otro lado, se ha detectado *in vivo* la existencia del ácido 9cRA en concentraciones muy bajas en el plasma al igual que las enzimas implicadas en su síntesis (Romert *et al.*, 1998), sin embargo hasta el momento no está claro si el 9cRA es el ligando fisiológico del RXR. El ácido fitánico (Lemotte *et al.*, 1996) y el ácido docosahexanoico (de Urquiza *et al.*, 2000) han sido descritos como los ligandos endógenos del RXR.

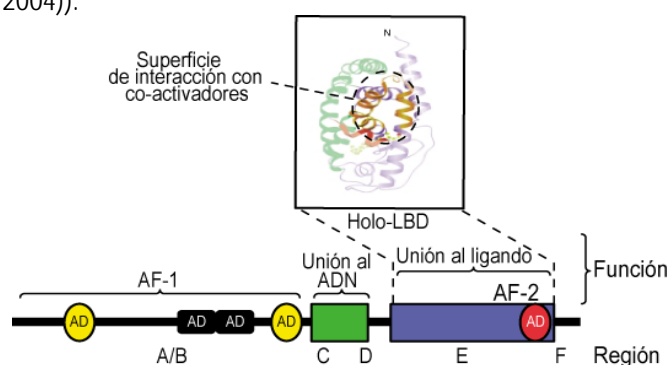
RAR y RXR pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares (NRs), estos son factores de transcripción activados por ligando que regulan específicamente la expresión de sus genes diana, en respuesta a retinoides, hormona tiroideas, lípidos u otras señales extracelulares. La superfamilia de receptores nucleares incluye los receptores de hormonas esteroideas, como estrógenos y glucocorticoides, así como receptores para hormonas no esteroideas, como hormonas tiroideas (TR), receptores de ácido retinoico (RAR), receptores de vitamina D (VDR), los receptores de los activadores de la proliferación de los peroxisomas (PPAR), así como receptores huérfanos denominados así porque sus ligandos aún no ha sido identificados o porque carecen de un sitio de unión al ligando (Aranda and Pascual, 2001; Sonoda *et al.*, 2008). Defectos en el funcionamiento de estos receptores tiene resultados graves en la proliferación, reproducción y metabolismo, provocando enfermedades como cáncer, infertilidad, obesidad o diabetes (Aranda and Pascual, 2001; Gronemeyer *et al.*, 2004).

Como el resto de receptores nucleares, RAR y RXR son proteínas modulares que comparten una organización común y contienen seis dominios diferentes de funcionalidad autónoma, pudiendo ser intercambiados entre receptores similares sin pérdida de función. Estos dominios se nombran con las letras de la A a la F desde el extremo N-terminal al C-terminal (Figura 2). En los NRs el *dominio A/B* está situado en el extremo amino terminal e incluye el dominio de transactivación independiente de ligando AF-1 (Nagpal *et al.*, 1993). Además, se ha observado la presencia de residuos diana de fosforilación por quinasas que se activan por diferentes rutas de señalización pudiendo influir en la actividad de los diferentes receptores de manera dependiente e independientemente del ligando (Rochette-Egly, 2003). El *dominio de unión al ADN* (DBD) o región C, es la región más conservada en todos los miembros de la superfamilia de receptores nucleares. Se caracteriza por presentar dos dedos de zinc, cada uno de ellos coordinado de forma tetraédrica por cuatro residuos de cisteína (Luisi *et al.*, 1991). La región E o *dominio de unión al ligando* (LBD), es la segunda región más conservada responsable de la unión al ligando, así como de la homo o heterodimerización, y de la interacción con cofactores y consecuentemente de la transactivación (dominio AF-2), y en algunos casos, de la represión transcripcional dependiente de ligando (Baretino *et al.*, 1994; Durand *et al.*, 1994). Entre los dominios DBD y LBD se encuentra localizada la región bisagra proporcionando un efecto estabilizador de la estructura general del receptor (dominio D) (Pissios *et al.*, 2000). Por último, el *dominio F*, se encuentra únicamente en el receptor RAR, y está ausente en el receptor RXR. Se postula, que su estado fosforilado (Bastien *et al.*, 2000) podría estar modulando los dominios de activación AF-1 y/o AF-2 como en el caso del receptor de estrógenos (Metivier *et al.*, 2001; Montano *et al.*, 1995).

El receptor RAR está codificado por tres genes α , β y γ , y mediante selección de promotores alternativos o *splicing* diferencial se generan varias isoformas de cada uno: RAR α 1 y RAR α 2, RAR β 1, RAR β 2, RAR β 3 y RAR β 4, RAR γ 1 y

RAR γ 2. Del mismo modo existen tres genes del receptor RXR, que codifican para RXR α , RXR β y RXR γ (Chambon, 1996). A pesar de que los receptores RAR y RXR se expresan constitutivamente en el embrión y el organismo adulto, los patrones de expresión de RAR y RXR son específicos del tipo celular y la etapa del desarrollo, lo cual refleja su función pleiotrópica (Dolle, 2009). RXR, es un miembro peculiar de la superfamilia ya que puede formar homo o heterodímeros con otros receptores nucleares, a diferencia de RAR que únicamente puede formar heterodímeros con RXR. RXR es capaz de unirse con diferentes miembros de la superfamilia de receptores nucleares, incluyendo, como ya hemos mencionado, RAR, PPAR, TR, VDR, además de FXR (*Farnesoid X Receptor*), CAR (*Constitutive Androstane Receptor*), LXR (*Liver X Receptor*), PXR (*Pregnane X Receptor*) o receptores huérfanos como NGFI-B (*Nerve Growth Factor Inducible-B*) (para revisión ver (Laudet and Gronemeyer, 2002; Szanto *et al.*, 2004)).

Figura 2. Organización estructural y funcional de los receptores nucleares. AD, dominio de activación; AF-1, función de activación transcripcional independiente de ligando; AF-2, función de activación transcripcional dependiente de ligando; LBD: dominio de unión al ligando. (Clarke *et al.*, 2004a)



2.2 Señalización mediada por los receptores de retinoides

2.2.1 Regulación de la transcripción por el heterodímero RXR-RAR

El heterodímero RXR-RAR regula la transcripción génica a través de la unión a secuencias específicas de las regiones promotoras de sus genes diana. Los elementos de respuesta al ácido retinoico (RAREs) están compuestos de repeticiones directas del motivo hexamérico PuG(G/T)TCA (Mader *et al.*, 1993; Mangelsdorf and Evans, 1995; Umesono *et al.*, 1991). En el RARE consenso, las dos repeticiones directas están espaciadas por cinco pb y se le denomina DR5. RXR puede igualmente unirse a elementos DR1 como homodímeros o heterodímeros con PPARs.

Actualmente, se ha propuesto un modelo en tres etapas por el cual los heterodímeros RXR-RAR regulan la activación de la transcripción de genes diana en respuesta a AR (Figura 3), que aparece descrito con detalle en el pie de la figura 3 (Aranda and Pascual, 2001; Bastien and Rochette-Egly, 2004; Dilworth and Chambon, 2001).

La actividad de los receptores de ácido retinoico no solamente se modula por la unión a ligando sino que otras vías de transducción de señales pueden afectar su actividad por medio de modificaciones post-traduccionales, de las que cabe destacar la fosforilación, la acetilación y la ubiquitinación (Fu *et al.*, 2004). Así, RARs y RXRs son sustratos de una gran variedad de quinasas, de entre las que cabe destacar las MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) como Erk, JNK y p38, la PKA (*Protein Kinase A*), la PKC (*Protein Kinase C*), la Akt y las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) (Rochette-Egly, 2003).

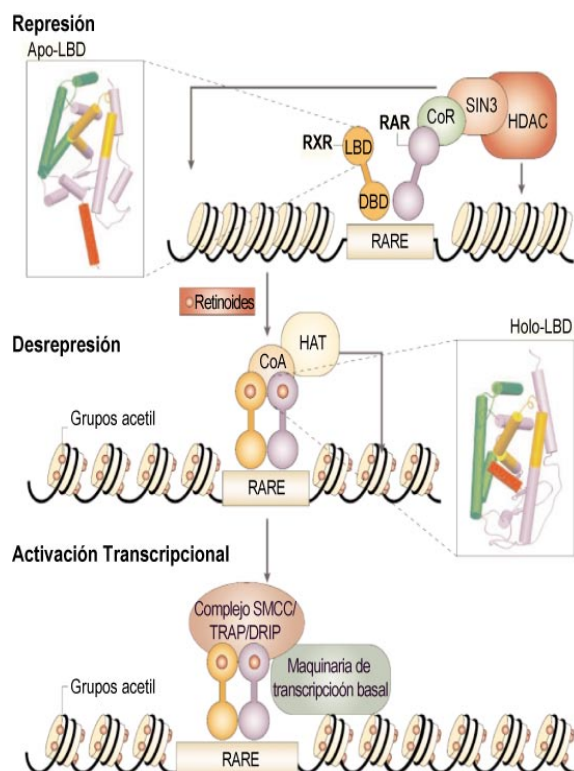


Figura 3. Mecanismo de acción de los receptores nucleares RXR-RAR en presencia y ausencia de ligando. En ausencia de agonistas de RAR, el heterodímero RXR-RAR, estaría unido a correpresores (CoR) como N-CoR y SMRT reclutando a su vez complejos proteicos con actividad desacetilasa de histonas (HDACs) a través de SIN3. Las HDACs eliminan los grupos acetilo de las histonas de los nucleosomas, lo que resulta en la condensación de la cromatina y el silenciamiento de los genes. La unión del ácido retinoico induce un cambio conformacional en el dominio LBD del receptor (Apo-LBD), para dar lugar al Holo-LBD (la hélice 12 que se muestra en rojo, cambia su posición). Este cambio estructural desestabiliza las superficies de unión con los correpresores y permite la interacción con los coactivadores (CoA) de la familia P160 (SRC1, TIF2 y AIB1 en humanos). La hélice H12 en el Holo-LBD contribuye a la superficie de interacción con los CoAs. Los CoAs reclutan (o forman un complejo pre-existente con) acetiltransferasas de histonas (HATs), como CBP (proteína de unión a CREB) o p300. La actividad HATs resulta en la acetilación de los extremos amino-terminal de las histonas, lo que produce la relajación y la descondensación de la cromatina. El posterior reclutamiento de un tercer complejo multiproteico, denominado indistintamente SMCC (*SRB/MED-containing cofactor complex*), TRAP (*Thyroid-hormone-Receptor Associated Protein*) o DRIP (*Vitamin D Receptor-Interacting Protein*) establece el contacto con la maquinaria de transcripción basal de la célula, lo que lleva a una mayor frecuencia en la iniciación de la transcripción de los genes diana para el AR. DBD, dominio de unión al ADN; RAR, receptor del ácido retinoico; RXR, receptor del retinoide X; RARE, elemento de respuesta al ácido retinoico. (Adaptado de (Altucci and Gronemeyer, 2001)).

2.2.2 Interferencia con otras vías de señalización

Los receptores de ácido retinoico pueden interferir sobre otras vías de señalización modulando de manera positiva o negativa la expresión de genes que no contienen RAREs. Actualmente, los mecanismos de interferencia o *crosstalk* de los receptores de ácido retinoico con otros factores de transcripción o rutas de señalización no se han dilucidado en su totalidad.

Un ejemplo de este *crosstalk* es la represión recíproca de la activación de la transcripción que se establece entre los RARs y el complejo AP-1 (factores de transcripción compuestos por proteínas de la familia de Jun y de Fos) (Li *et al.*, 1996) (para revisión ver (Laudet and Gronemeyer, 2002)). Las proteínas Jun/Fos que forman el complejo AP-1 regulan programas genéticos implicados en la proliferación celular. Se ha visto que los heterodímeros RAR-RXR, en presencia de AR, reprimen la expresión de genes que contienen sitios AP-1 (Altucci and Gronemeyer, 2001; Schule *et al.*, 1991). Este efecto es mutuo y los complejos AP-1 pueden modular positiva o negativamente la actividad de los RARs (Shemshedini *et al.*, 1991). Las bases moleculares de este antagonismo recíproco no están aún claras aunque existen en la literatura varias hipótesis que han tratado de explicarlo (ver referencias y revisión en (Altucci and Gronemeyer, 2001)). Por lo tanto, se piensa que ciertos efectos antitumorales de los retinoides resultan de su actividad anti- AP-1, por ejemplo en modelos de carcinogénesis químicamente inducida.

Los receptores para el ácido retinoico pueden interferir con otras vías de señalización directamente implicadas en el desarrollo del cáncer. Se ha descrito recientemente que los receptores de ácido retinoico modulan la respuesta a TGF- β de manera dependiente de ligando, así los agonistas para RAR reprimen la transcripción dirigida por Smad mientras que los antagonistas para RAR la potencian. Otro ejemplo de vía de señalización reprimida por los receptores de AR es la vía oncogénica de la β -catenina (Easwaran *et al.*, 1999).

2.2.3 Efectos no genómicos del AR

El mecanismo de regulación clásico de los receptores nucleares es de tipo genómico. Sin embargo, en los últimos años, se han descrito efectos no genómicos de hormonas mediadas por sus receptores ocurridos de forma rápida (Levin, 2005; Losel and Wehling, 2003). En la bibliografía se han descrito una gran variedad de acciones que ocurren en pocos segundos o minutos después de la adición de la hormona. Dichas acciones no son bloqueadas incluso en presencia de inhibidores de la transcripción como actinomomicina D o de la traducción como cicloheximida. En general, estos efectos no genómicos rápidos, son aquellos mediante los cuales los NRs de prácticamente todas las hormonas esteroideas y las no esteroideas, son capaces de regular otras vías de señalización molecular. Muchos de estos efectos no genómicos implican la adenil-ciclase, receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), receptores tirosina-quinasa que desencadenan rutas de señalización a través de Scr, MAPKs, PI3K/AKT, y la concentración de Ca^{2+} o el pH intracelular. Así, los efectos de los estrógenos (por ejemplo la vasodilatación) o de los corticoides (efecto antiinflamatorio) sobre el sistema cardiovascular son mediados en parte por la activación de la vía PI3K/AKT/eNOS por ER (Simoncini *et al.*, 2000) o GR (Hafezi-Moghadam *et al.*, 2002) en las células endoteliales vasculares.

Recientemente se han descrito mecanismos no genómicos inducidos por AR a través de sus receptores en los que están implicadas las vías de señalización intracelular ERK y AKT/PKB. Se ha descrito que el AR activa la vía de señalización PI3K/AKT, y que dicha activación es requerida para la diferenciación de las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (Lopez-Carballo *et al.*, 2002). Posteriormente, este mismo grupo demostró la activación de la vía de las MAPK/ ERK1/2 en células de neuroblastoma tratadas con AR (Masia *et al.*, 2007).

3. Señalización por retinoides en cáncer

Como hemos mencionado anteriormente (apartado 1.3.), desde hace décadas se han publicado diversos trabajos que asocian el desarrollo de determinados tipos de cáncer con la deficiencia en la ingesta de vitamina A. Estas observaciones han conducido a la hipótesis de que concentraciones fisiológicas de la vitamina A preservan al organismo frente al desarrollo de lesiones premalignas y malignas. Además, más recientemente se ha demostrado que la síntesis y el metabolismo de los metabolitos activos de la vitamina A están alterados en células tumorales comparado con células humanas normales. Por ejemplo, los niveles de la enzima que sintetiza el *atRA*, la RALDH2, se expresa en niveles muy bajos en células de cáncer de mama y de próstata (Kim *et al.*, 2006b; Mira *et al.*, 2000; Touma *et al.*, 2009) o la CYP26A1, un enzima que metaboliza el AR a formas más oxidadas, se sobre-expresa en tumores primarios de mama y promueve la tumorigénesis (Osanai *et al.*, 2010). Por otro lado, y ya que los receptores de los retinoides son los mediadores más próximos de los efectos de los retinoides en la regulación de la expresión génica, desde temprano se asumió que cambios en su expresión y función pueden provocar aberraciones en la respuesta celular a los retinoides alterando el correcto crecimiento y diferenciación celular, y ser por tanto, causa de un fenotipo transformado. En este sentido, se ha demostrado que la expresión alterada o aberrante de los receptores para retinoides RAR está asociada a procesos de transformación maligna en células humanas. Dos ejemplos son: el caso de la leucemia aguda promielocítica, en la que el receptor $\text{RAR}\alpha$ está fusionado a otra proteína y por tanto tiene alterada su actividad, y el caso de $\text{RAR}\beta$ donde su pérdida de expresión está asociada a las primeras etapas de carcinogénesis en distintos tipos de tumores, entre ellos se encuentra el cáncer de mama, modelo utilizado en este estudio.

3.1 La leucemia aguda promielocítica: un ejemplo de asociación entre expresión aberrante de los receptores de ácido retinoico y el cáncer

Uno de los ejemplos mejor estudiados de la asociación entre la expresión alterada de los receptores de AR y el cáncer es la APL. El caso de la APL representa uno de los tipos de cáncer mejor conocido a nivel molecular y encarna el ejemplo más exitoso de los retinoides como agentes farmacológicos en terapia del cáncer (Soprano *et al.*, 2004). La APL es un subtipo de leucemia mieloide aguda, caracterizada por la proliferación incontrolada de precursores mieloides inmaduros, bloqueados en el estadio de promielocito, que muestran una translocación recíproca entre los cromosomas 15 y 17, t(15;17) (q22;q11.2-q12). Como consecuencia se produce una fusión del gen situado en el locus 15q22, denominado PML (*Promyelocytic Leukaemia*), con el gen del receptor para el ácido retinoico, RAR α , localizado en 17q12-21, resultando en la formación de la oncoproteína de fusión PML-RAR α (de The *et al.*, 1990; de The *et al.*, 1991). RAR α puede aparecer fusionado a otros cinco genes diferentes, dando resultado igualmente a la APL, aunque en el 95% de los casos el gen implicado en la translocación es el que codifica por la proteína PML, generando la proteína PML-RAR α de la que hablábamos antes y su recíproca RAR α -PML (de The *et al.*, 1991). El mecanismo oncogénico de la proteína de fusión PML-RAR α implicaría una mayor eficiencia de unión al complejo correpresor-HDACs y las DNA metiltransferasas asociadas (DNMTs), que resultaría en el silenciamiento epigenético de genes regulados por los retinoides entre los que se encontrarían genes implicados en la diferenciación mieloide (Villa *et al.*, 2006). El tratamiento con dosis farmacológicas del ácido atRA reduce la ocupación de los promotores, que son diana de PML-RAR α , por los correpresor/HDACs/DNMTs restaurando la señalización por RAR α , la transcripción de los genes diana para RAR y consecuentemente la diferenciación de las células mieloides (Morey *et al.*, 2008).

Por otro lado, se ha identificado un grupo determinado de microRNAs regulados por el ácido retinoico en blastos de pacientes con APL que difiere del regulado en promielocitos normales (Careccia *et al.*, 2009), el papel de estos microRNAs regulados por AR en este y en otros tipos de cáncer es un tema de máximo interés en la actualidad (Meseguer *et al.*, 2011).

3.2 Señalización por RAR alterada y silenciamiento de RAR β 2 en carcinomas

Al contrario que en la APL donde el receptor de RAR α está mutado, los RARs ni están mutados ni se ha encontrado que formen parte de una oncoproteína en carcinomas (Mongan and Gudas, 2007). Sin embargo, la señalización por los receptores de ácido retinoico está de algún modo bloqueada en células de carcinoma en contraste con el tejido epitelial normal que lo rodea. Mientras que la expresión de RAR β 2 está frecuentemente perdida durante el proceso de carcinogénesis epitelial, como más tarde describiremos en este apartado, la actividad de RAR α se ve solo afectada algunas veces (Farias *et al.*, 2002; Kupumbati *et al.*, 2006; Pozzi *et al.*, 2006).

Distintas evidencias indican que el receptor RAR β 2 actúa como un supresor tumoral, ya que frecuentemente este receptor no se expresa o su expresión disminuye dramáticamente durante el proceso de carcinogénesis en diferentes tipos de tumores sólidos como el cáncer de mama, de pulmón y de cabeza y cuello, lo que se asocia al bloqueo de la señalización por retinoides (Wan *et al.*, 1999; Widschwendter *et al.*, 1997a; Xu *et al.*, 1997a; Xu *et al.*, 1997b). En células de carcinoma embrionario, las vías de señalización que inducen la inhibición de la proliferación están reguladas predominantemente por RAR β (Faria *et al.*, 1999). La expresión exógena de RAR β en las células tumorales altera su

capacidad tumorigénica (Houle *et al.*, 1993). Además en ratones transgénicos que expresan una secuencia anti-sense de RAR β desarrollan mayor número de lesiones cancerosas con respecto a los ratones control. RAR β contiene en su región promotora un elemento de respuesta al ácido retinoico y como tal, es una diana directa de la acción de los retinoides (Hoffmann *et al.*, 1990). La inducción de RAR β por retinoides podría ser por tanto un elemento clave en la actividad antitumoral del AR. En este sentido, la expresión exógena de RAR β en células de cáncer de mama resistentes a la acción antiproliferativa de los retinoides permite restaurar la sensibilidad a los mismos sugiriendo que RAR β media la actividad antiproliferativa de los retinoides (Seewaldt *et al.*, 1995; Wan *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1997a). Sin embargo, no se ha observado que los ratones que poseen deplecionado el receptor RAR β desarrollen espontáneamente tumores (Mendelsohn *et al.*, 1994).

Un gran número de estudios han intentado determinar el mecanismo responsable de la pérdida de expresión de RAR β en las células tumorales. No se ha observado ningún cambio en la estructura del gen como mutaciones o reorganizaciones (Bartsch *et al.*, 1992; Hu *et al.*, 1991). Por el contrario, diversos estudios han sugerido que fenómenos de naturaleza epigenética podían ser responsables de la pérdida de expresión de RAR β . La metilación aberrante del promotor de RAR β parece ser el mecanismo que conduce al silenciamiento génico. Estudios efectuados utilizando biopsias de pacientes o células de cáncer de mama han identificado distintos residuos 5-metil-citosina en la región -46 a +251 pb del promotor (Widschwendter *et al.*, 2001; Youssef *et al.*, 2004). Adicionalmente, se ha demostrado la hipoacetilación de la histona H3 en el contexto del promotor RAR β . RAR β es uno de los genes supresores de tumores que con más frecuencia se encuentra silenciado en células tumorales (Esteller *et al.*, 2002). Concretamente, se ha descrito que el silenciamiento inducido por la metilación del DNA reprime la expresión de RAR β en líneas celulares de cáncer de mama, a diferencia de células de mama no neoplásicas donde el gen RAR β se expresa en estado desmetilado. El uso de agentes desmetilantes como 5-aza-2'-desoxicitidina o de inhibidores de las HDACs sensibilizan las células tumorales al AR y permiten la expresión de RAR β , ofreciendo una nueva modalidad terapéutica en este tipo de cáncer (Sirchia *et al.*, 2000; Sirchia *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002). De hecho, actualmente, ciertos inhibidores de HDACs están siendo evaluados en diversos ensayos clínicos. Por otro lado, la metilación del promotor de RAR β podría utilizarse como marcador molecular para el diagnóstico de los primeros estados del cáncer adaptando en consecuencia el tipo de terapia que debe ser aplicada (Lotan and Lotan, 2004).

3.3 RARs interaccionan con la vía de señalización de los estrógenos en células de cáncer de mama

El cáncer de mama es uno de los más comunes entre la población femenina en países desarrollados. Aproximadamente, entre 10-15% de mujeres en todo el mundo se le diagnosticará cáncer de mama a lo largo de su vida. El cáncer de mama se origina a partir de células que poseen receptores para diferentes hormonas esteroideas que se sintetizan en los ovarios, y en este sentido, existen evidencias de que tanto los estrógenos como la progesterona juegan un papel importante en el control del crecimiento y la diferenciación de las células de cáncer de mama. Además de la producción de estrógenos desde el ovario, los estrógenos pueden ser producidos localmente a partir del procesamiento de los andrógenos por la enzima aromatasa. Mientras que la privación hormonal, el uso de terapias anti-hormonales como el tamoxifeno (antagonista del receptor de estrógenos) o los inhibidores de aromatasas han resultado efectivos para pacientes de cáncer

de mama post-menopáusicas con tumores positivos para el receptor de estrógenos, la quimioterapia y la radioterapia son las únicas opciones para mujeres con estadios más avanzados de la enfermedad.

Además de receptores para estrógenos y progesterona, las células del epitelio mamario poseen receptores para el ácido retinoico que contribuyen al mantenimiento de la diferenciación del epitelio mamario normal, y como hemos visto en la anterior sección, diversas evidencias sugieren que una señalización alterada del ácido retinoico parece estar implicada en la carcinogénesis de mama. Además, diversos trabajos tanto en células de cáncer de mama *in vitro* como en modelos animales, indican que el AR posee una importante actividad antiproliferativa y por lo tanto contraria a los efectos de los estrógenos en células de cáncer de mama. Estudios recientes realizados por Hua *et al.* han revelado la existencia de una potencial interacción funcional entre la señalización por el AR y la señalización por estrógenos en el cáncer de mama humano, concluyendo que la activación de la vía de señalización del AR antagoniza la señalización de los estrógenos en las células de cáncer de mama y, al contrario, que ER α unido a los estrógenos pueden antagonizar la señalización del AR (Hua *et al.*, 2009). Estos datos sugieren que los agonistas de RAR deben tener actividad antiproliferativa en el cáncer de mama positivo para ER α (Dawson *et al.*, 1995). Otro estudio sugiere que el RAR α es una parte integrante del complejo transcripcional de ER α en las células de cáncer de mama MCF-7 tratadas con estrógenos (Ross-Innes *et al.*, 2010).

3.4 Retinoides y la terapia del cáncer

Estudios preclínicos, epidemiológicos y clínicos demuestran la importancia del uso de retinoides en la prevención y/o el tratamiento del cáncer (Hong and Sporn, 1997). Los retinoides presentan un interés especial en la investigación del cáncer, por sus propiedades como agentes terapéuticos y preventivos, ya que inducen la diferenciación, tienen efectos antiproliferativos y antioxidantes (Niles, 2004).

3.4.1 Retinoides en terapia

Diferentes formas de retinoides y rexinoides están siendo utilizados en clínica: el ácido atRA (tretinoína), el ácido 9cRA (alitretinoína), el ácido 13cRA (isotretinoína), el LG1069 (targretina) y los retinoides atípicos como la fenretinida. Numerosos datos preclínicos y clínicos hacen referencia a las aplicaciones clínicas más relevantes de los retinoides en el tratamiento de un gran número de tumores sólidos y lesiones precancerosas. Pero, el ejemplo de utilización más efectiva de los retinoides en terapia es en la APL como demuestran numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* (Altucci and Gronemeyer, 2001; Clarke *et al.*, 2004a).

Desde el año 1988 en el que se descubrió el éxito antitumoral que suponía el tratamiento con atRA en pacientes diagnosticados con APL (Huang *et al.*, 1988), numerosos estudios han tratado de optimizar la eficacia del tratamiento de retinoides en la APL mediante el estudio del mecanismo de acción que promueve la terapia de diferenciación (Chomienne *et al.*, 1996). Se conoce que la terapia de diferenciación del cáncer por el tratamiento con retinoides intenta reactivar vías de transducción de señales que están inactivadas o suprimidas durante el proceso de carcinogénesis, forzando a la célula tumoral a adoptar un fenotipo diferenciado, y en algunos casos induciendo finalmente la apoptosis. Actualmente, el éxito de la terapia de diferenciación en el tratamiento de la APL se debe al atRA, el cual combinado con antraciclinas produce la remisión de la enfermedad en el 70-80% de los pacientes (Lengfelder *et al.*, 2005). Finalmente, el trióxido de arsénico ha

demostrado tener un efecto apoptótico selectivo y efectivo en pacientes de APL con recaída que presentan resistencia a atRA o a quimioterapia (Au *et al.*, 2002).

Además, los retinoides se usan en el tratamiento de enfermedades visuales y dermatológicas (Fisher *et al.*, 1996). Su eficiencia está demostrada en diferentes desórdenes de la piel como el acné, la psoriasis o el Sarcoma de Kaposi (Duvic *et al.*, 2000). La allitretionina, fue aprobada por la FDA en 1999 para el tratamiento de lesiones cutáneas de sarcoma de Kaposi (Baumann *et al.*, 2005). Además del sarcoma de Kaposi, los retinoides se utilizan igualmente en la terapia de otros dos tipos de cáncer: el 13cRA es utilizado en el caso de neuroblastoma de tipo IV después de la cirugía (Reynolds *et al.*, 2003) y el rexinoide LG1069 se utiliza actualmente como segundo tratamiento en formas cutáneas de linfomas T (Zhang and Duvic, 2003).

Actualmente, existen ensayos clínicos en curso para evaluar el uso de retinoides en otros tipos de cáncer. Los pan-agonistas de RAR y RXR, como atRA, 9cRA y 13cRA, combinados con otros agonistas y antagonistas de otros miembros de la superfamilia de NR (Vitamina D, esteroides, ligandos PPAR γ) han demostrado una actividad antitumoral significativa para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer en ensayos clínicos. Actualmente, la tretionina se encuentra en ensayos clínicos para el tratamiento de melanoma, cáncer de pulmón, de cérvix, riñón, glioblastoma y neuroblastoma. Además, evidencias clínicas sugieren la combinación de retinoides con inmunoterapia como un tratamiento eficaz contra el neuroblastoma (Vertuani *et al.*, 2003).

En la actualidad, el cáncer de mama es uno de los tipos de tumores sólidos en los que se está realizando ensayos con retinoides naturales y sintéticos, que se encuentran en fase I, II y III. La combinación de retinoides con el interferón y el tamoxifeno resultó ser prometedora en ensayos clínicos en fase II de cáncer de mama metastásico (Recchia *et al.*, 2009).

3.4.2 Retinoides en prevención

Los retinoides pueden prevenir el cáncer inhibiendo la progresión de estadios premalignos y malignos. Ensayos epidemiológicos y experimentales indican que los retinoides reducen el riesgo de cáncer. Estudios realizados en animales y ensayos clínicos sugieren que los retinoides inhiben el proceso de carcinogénesis interfiriendo con la fase de progresión de la misma y menos con la fase de iniciación. Actualmente, el mayor número de ensayos clínicos están dirigidos a (i) pacientes que presentan lesiones premalignas y (ii) pacientes tratados de un primer cáncer y que presentan un riesgo elevado de recidiva (revisión en (Sun and Lotan, 2002)).

En la primera categoría, los retinoides clásicos son efectivos en el tratamiento de tres lesiones precancerosas, leucoplaquia (lesión de la cavidad bucal y el esófago), queratosis actínica (lesión de la piel tras la exposición al sol) y displasia del cérvix, siendo utilizados en clínica (Sun and Lotan, 2002). Los retinoides son igualmente eficaces en la prevención de recidivas de tumores primarios, se utilizan para evitar el desarrollo del cáncer de piel en individuos con *xeroderma pigmentosa*, una predisposición genética al cáncer de piel inducido por la luz UV (Boisnic *et al.*, 1994; Kraemer *et al.*, 1992; Meyskens *et al.*, 1994; Peck, 1986). Además, se han obtenidos resultados prometedores en el tratamiento del cáncer de mama, el uso de fenretinida disminuye la incidencia de tumores de mama contralaterales en mujeres premenopáusicas (Bonanni *et al.*, 2007; Veronesi *et al.*, 1999). Otros estudios con animales indican que el LG1069 combinado con el tamoxifeno inhibe el desarrollo de tumores (Bischoff *et al.*, 1998), aunque esta combinación se encuentra aún en ensayos clínicos. Otro retinoide atípico, el ácido poliprénico previene la aparición de un segundo

hepatocarcinoma primario (Muto *et al.*, 1996; Takai *et al.*, 2005). Dos estudios han demostrado que la combinación de 13cRA con interferón- α y el α -tocoferol inhibe el desarrollo de lesiones cancerosas secundarias de cabeza y cuello. Por el contrario, en el caso del cáncer de pulmón, los retinoides no han demostrado ser eficaces pero existen ensayos clínicos en curso donde se evalúan su eficacia combinados con otras moléculas (Tsao *et al.*, 2004).

3.4.3 Retinoides en terapia combinada

Como mencionamos anteriormente una manera de disminuir la toxicidad de los retinoides manteniendo sus efectos antitumorales consiste en disminuir las dosis utilizadas y combinar a estos con otros tratamientos. En este sentido, agentes quimioterapéuticos como el taxol o el cisplatino pueden sinergizar con los retinoides en el tratamiento de células tumorales de mama y de la piel (Shin *et al.*, 2002; Vivat-Hannah *et al.*, 2001). El efecto pro-apoptótico inducido por 9cRA y el tamoxifeno se ha descrito también en líneas celulares de hepatocarcinoma *in vitro* (Herold *et al.*, 2002). La combinación de agonistas selectivos para RAR α/β con taxol, vinblastina y cisplatino, incrementan la apoptosis de modo sinérgico en células de carcinoma de cabeza y cuello, mama y ovario (Vivat-Hannah *et al.*, 2001). Otros estudios han descrito que el atRA sólo o en combinación con melarsoprol presenta un incremento en la actividad antiproliferativa en células de cáncer de mama y próstata *in vitro* e *in vivo* (Koshiuka *et al.*, 2000).

Los retinoides atípicos han demostrado un gran potencial antiproliferativo en combinación con agentes quimioterapéuticos y existen actualmente ensayos clínicos en el caso de los neuroblastomas, cáncer de ovario y cáncer de próstata (Ortiz *et al.*, 2002). Retinoides, como el LG1069 que muestran una toxicidad reducida si los comparamos con otros retinoides, han demostrado ser efectivos para el tratamiento del cáncer de pulmón en asociación con agentes quimioterapéuticos (Rigas and Dragnev, 2005).

Una de las combinaciones más extensamente estudiadas es la combinación de los retinoides con el interferón, por sus efectos antitumorales e inmunoestimuladores (Parmar and Platanias, 2003). Los interferones fueron descubiertos por primera vez en 1957 por Isaacs y Lindenmann, quienes observaron la existencia de una sustancia que confería resistencia a las células del embrión de pollo ante una infección de origen viral (Isaacs and Lindenmann, 1957; Isaacs *et al.*, 1957). En 1965, Wheelock describe otro tipo de interferón el cual se clasifica como tipo II o IFN γ tanto por su situación cromosómica diferente, así como su expresión o liberación ante diferentes estímulos biológicos (Wheelock, 1965). Los IFNs son considerados como una familia de glicoproteínas producidas por las células de vertebrados ante diferentes estímulos biológicos. Estas son inducidas por virus, bacterias, protozoos, ciertas citoquinas, ARN de doble cadena tanto natural como sintético y otras sustancias. Los interferones se clasifican atendiendo a su estructura génica y proteica, así el IFN de tipo I, engloba 14 isoformas diferentes del IFN α , e isoformas individuales de IFN β , IFN ϵ , IFN ω y IFN κ , mientras que el IFN de tipo II engloba solo al IFN γ . Recientemente, se ha clonado el IFN λ , con 3 isoformas diferentes. El IFN γ , en particular, está críticamente implicado en la respuesta inmune innata y adaptativa frente a infecciones intracelulares virales y bacterianas, y en el control del crecimiento tumoral, son capaces de inhibir la proliferación celular e inducir la apoptosis de diversos tipos de células tumorales (Belardelli and Ferrantini, 2002; Ikeda *et al.*, 2002); además varios estudios genéticos han confirmado su papel en la vigilancia ejercida por las células T citotóxicas y las células *natural killer* del sistema inmune frente al crecimiento tumoral (Leggatt *et al.*, 2002). En particular, la vía de señalización de TRAIL está implicada en esta vigilancia dependiente del IFN γ que ejercen las células *natural killer* (Smyth *et al.*, 2003; Takeda *et al.*, 2005; Takeda *et al.*,

2001; Takeda *et al.*, 2002). Los IFNs ejercen su acción a través de receptores específicos de la superficie celular. El IFN γ , en concreto, se une a su receptor, IFNGR, el cual envía una señal hacia el núcleo a través de la vía de transducción JAK-STAT. Las proteínas STAT son factores de transcripción citoplasmáticos que se fosforilan por la quinasa JAK-2. Una vez fosforiladas STAT-1 y STAT-2 reclutan un tercer factor, IRF9 (o p48) constituyendo un complejo denominado ISGF3 (*IFN-Stimulated Gene Factor-3*) que se transloca al núcleo y se une a elementos de respuesta a interferón (ISRE) presentes en los genes diana para el IFN (ISGs) (Pestka *et al.*, 2004). Uno de los genes de primera línea que son inducidos por la vía de señalización JAK/STAT activada por el IFN γ es el factor de transcripción IRF1 (*IFN Regulatory Factor-1*). IRF1, a su vez, activa un gran número de genes de respuesta secundaria (Boehm *et al.*, 1997).

Desde hace años, se conoce que la combinación de retinoides e interferones presenta actividad antiproliferativa y bloquea la progresión tumoral (Lippman *et al.*, 1992a; Lippman *et al.*, 1992b; Marth *et al.*, 1986). A este respecto, los estudios de Fanjul *et al.* demuestran los efectos antitumorales aditivos, y en algunos casos incluso sinérgicos, del uso de los retinoides en combinación con interferones en cultivos de células de carcinoma de mama de manera dependiente de los receptores RAR γ (Fanjul *et al.*, 1996). Asimismo, ligandos selectivos del receptor RAR (atRA y 13cRA) en combinación con interferón, principalmente IFN α , han sido una de las combinaciones más estudiadas en los últimos años en células de cáncer de ovario, mama, cabeza y cuello, cérvix, leucemia mieloide crónica y de mieloma múltiple avanzado, tanto *in vitro* como en modelos de ratones trasplantados (Benthin *et al.*, 2001; Lam *et al.*, 2001; Lingen *et al.*, 1998; Massad *et al.*, 1996; Musto *et al.*, 1997). Se ha descrito que estas terapias combinadas pueden ser eficaces en algunos tumores sólidos, tales como carcinomas de células escamosas (Altucci and Gronemeyer, 2001; Lippman *et al.*, 1997) y en la actualidad varios ensayos clínicos están en curso (Ortiz *et al.*, 2002). Se ha demostrado el efecto inmunomodulador de dosis bajas de IFN α y 9cRA en pacientes con Sarcoma de Kaposi (Somos and Farkas, 2000). Además, la combinación de isotretinina e IFN α ha demostrado tener un efecto antitumoral significativo y ser bien tolerado en pacientes con neoplasias linfoides (Tsimberidou *et al.*, 2004).

4. Efectos antitumorales de los retinoides: efectos sobre la proliferación, la diferenciación celular y la apoptosis

El efecto antitumoral de los retinoides se conoce desde hace décadas y no se limita a las células de la APL, los retinoides regulan la proliferación, la diferenciación y la apoptosis de diferentes tipos de células cancerosas, incluyendo los neuroblastomas, el cáncer de mama y de pulmón y las leucemias mieloides agudas (Briel *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1996; Melino *et al.*, 1997; Nagy *et al.*, 1995; Spanjaard *et al.*, 1997). Aunque cada vez se conoce más acerca de los mecanismos moleculares por los que los retinoides regulan estos procesos celulares, todavía queda mucho por explorar en este campo. En general, la actividad anticancerígena del ácido retinoico se piensa que resulta de los efectos directos e indirectos que tiene sobre la expresión génica y en este sentido numerosos trabajos se han focalizado en la regulación de la expresión de genes de función conocida que participan en el control del ciclo celular y la diferenciación. Recientemente, la implantación de tecnologías de análisis masivo de la expresión génica ha permitido analizar a gran escala los programas génicos inducidos o reprimidos por el tratamiento con el AR. Este tipo de análisis han identificado un gran número de genes cuya expresión está regulada por el AR, que están asociados a su efectos sobre la proliferación y la diferenciación celular, y cuya implicación funcional en estos procesos biológicos está siendo evaluada en la actualidad (Chen *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006a; Meani *et al.*, 2005; Wallden *et al.*, 2005).

4.1 Parada de la proliferación y diferenciación celular inducida por los retinoides

Las células tumorales acumulan mutaciones que tienen como resultado una proliferación celular aberrante y la inestabilidad del ADN y de los cromosomas, debido a una regulación deficiente de las actividades de las CDKs que junto con las ciclinas regulan el ciclo celular (Malumbres and Barbacid, 2009). Así las ciclinas, CDKs, y los factores reguladores de CDKs son dianas para la inhibición de la proliferación de las células cancerosas. Los retinoides a través de diferentes vías de señalización inhiben la progresión en el ciclo celular en una gran variedad de células de cáncer humano, directa o indirectamente a través de la modulación de dichas dianas moleculares. Por lo general, el AR causa un bloqueo en la fase G1 del ciclo celular, con un aumento en la proporción de células en la fase G0/G1 y una disminución en la proporción de células en fase S. Entre los RARs, el RAR β 2 que es inducible por AR, es el receptor que principalmente media los efectos inhibitorios del AR en la proliferación celular (Faria *et al.*, 1999; Seewaldt *et al.*, 1995). La progresión del ciclo celular está regulada por ciclinas y por los inhibidores de CDKs. RAR β 2 induce la expresión de los inhibidores del ciclo celular, como p21Cip1 y p27Kip1 (Li *et al.*, 2004; Suzui *et al.*, 2004). El tratamiento con retinoides incrementa la proteólisis y la ubiquitinación de la ciclina D1 en las células inmortalizadas bronquiales (Ma *et al.*, 2005b) e inhibe los niveles de ARNm y proteína de la ciclina D1 en células HepG2 de hepatoma humanas (Suzui *et al.*, 2004). La inhibición de los niveles de proteína de la ciclina D1 conduce a una disminución de la actividad de las CDKs, lo que tiene como consecuencia una disminución en la fosforilación de la familia de las proteínas de Rb, incluyendo Rb (*Retinoblastoma-Associated Protein*) y RBL1/p107 (*Retinoblastoma-Like Protein-1*). Las proteínas Rb y RBL1 hipofosforiladas no pueden liberar los factores de transcripción E2F que inducen la expresión de ciclina E1 y E2, por lo que las células no pueden entrar en el fase S desde la fase G1 (Malumbres and Barbacid, 2009).

4.2 Apoptosis: modulación por los retinoides

La parada de la proliferación y/o la diferenciación inducida por el AR puede estar o no seguida por la apoptosis dependiendo del contexto celular (Jimenez-Lara *et al.*, 2010). Así, el AR puede modular la expresión o la actividad de diferentes componentes de la maquinaria apoptótica. A continuación, describiremos los datos más actuales que tratan de explicar en general los mecanismos de la apoptosis haciendo énfasis sobre las vías que están implicadas en la apoptosis inducida por los retinoides.

La apoptosis o la muerte celular programada es un proceso activo que conduce a la destrucción de una célula siguiendo un programa molecular bien coordinado y regulado. A nivel morfológico, se traduce en una vesicularización de la membrana plasmática, fragmentación del citoplasma celular, la degradación de proteínas, la condensación de la cromatina y la degradación del ADN. Fisiológicamente, la apoptosis representa un modo por el cual el organismo controla la homeostasis tisular y se libra de las células potencialmente peligrosas como las células cancerosas. Así, una desregularización del proceso apoptótico, por exceso o por defecto, puede conducir a patologías como las enfermedades neurodegenerativas o el cáncer, respectivamente. Las células cancerosas, por mecanismos diversos, escapan al control apoptótico y proliferan de manera incontrolada. Una estrategia de terapia en el cáncer consiste en inducir la apoptosis de estas células utilizando agentes quimioterapéuticos. Se han descrito dos vías de señalización de la apoptosis, la vía “extrínseca” que responde a determinadas citoquinas y señales extracelulares, y la vía “intrínseca” que responde a determinadas señales durante el desarrollo o al estrés celular causado por la ausencia de factores de crecimiento, daño en

el ADN, estrés en el retículo endoplásmico, activación de oncogenes, infección viral, radiaciones ionizantes, radiaciones UV, etc. (Meier and Voustden, 2007). Las células pueden además morir por necrosis (Vandenabeele *et al.*, 2010). La activación de la vía intrínseca, extrínseca o la necrosis conduce a eventos celulares catastróficos, y es por ello que son vías muy reguladas. Los puntos de iniciación de estas vías en la célula pueden ser orgánulos como la mitocondria (Kelly and Strasser, 2011) o, alternativamente, existen numerosos ejemplos de macrocomplejos proteicos que actúan como plataformas de señalización en la célula y que inician el proceso de la muerte celular, estas se denominan: (i) DISC por "Death-Inducing Signaling Complex" (Lavrik *et al.*, 2005), (ii) el complejo II del TNF (Micheau and Tschopp, 2003), (iii) el Apoptosoma, (iv) el PIDDosoma (Tinel and Tschopp, 2004), (v) los complejos que incluyen los receptores tipo-Toll (Vercammen *et al.*, 2008a), (vi) el complejo RIG-1 (Friedman *et al.*, 2008; Rajput *et al.*, 2011) y (vii) el Ripoptosoma (Tenev *et al.*, 2011). En el seno de estas plataformas tiene lugar la activación de las caspasas, principales "actores" en el escenario de la apoptosis.

4.2.1 Las caspasas como ejecutoras de la apoptosis

Tanto la vía extrínseca como la vía intrínseca controlan o regulan la activación de las caspasas, proteínas que tienen un papel esencial en la propagación de la señal pro-apoptótica (Riedl and Shi, 2004). Las caspasas son una familia conservada de proteasas de cisteína que cortan específicamente sus sustratos después de un residuo de aspártico. Existen principalmente dos familias de caspasas: las caspasas iniciadoras (caspasa-8, -10, -9 y -2) que son activadas en el seno de macrocomplejos proteicos (las plataformas de señalización apoptótica que antes mencionábamos) tras un estímulo apoptótico, y las caspasas "ejecutoras" que están encargadas de la degradación proteolítica de un gran número de dianas celulares (caspasa-3, -6 y -7). Todas las caspasas son producidas como zimógenos inactivos y deben de ser activadas por procesamiento proteolítico. Una vez que las caspasa iniciadoras son activadas, inducen la activación de las caspasas ejecutoras que a su vez conducen a la degradación de sus sustratos dianas llevando a su vez a la destrucción completa de las células. Entre los sustratos diana de las caspasas ejecutoras está PARP (*Poly-ADP-Ribose Polymerase*), que usualmente es utilizado como marcador de la apoptosis e ICAD, cuya degradación permite la activación de CAD (*Caspase-Activated DNase*) que es responsable de la fragmentación del ADN.

4.2.2 La vía apoptótica mitocondrial

La ruta intrínseca de la apoptosis, inducida por estrés o agentes genotóxicos, da lugar a la activación de la maquinaria apoptótica mitocondrial (Figura 4). Estos estímulos causan la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, y la pérdida del potencial transmembrana, desencadenando la liberación de proteínas pro-apoptóticas del espacio intermembrana de la mitocondria al citosol (Saelens *et al.*, 2004; Wang, 2001). Estas proteínas incluyen citocromo c, SMAC/DIABLO, AIF que induce la degradación de cromatina y la fragmentación del ADN, endonucleasa G implicada en la degradación apoptótica del ADN y OMI/HtrA2 las cuales promueven la activación de la ruta mitocondrial dependiente de caspasas.

Un evento clave en la activación de la ruta intrínseca es la liberación del citocromo c. Una vez en el citosol se une a la proteína Apaf-1, permitiendo la unión del nucleótido dATP/ATP. La unión del nucleótido al complejo Apaf-1/ citocromo c provoca su oligomerización para la formación del llamado apoptosoma, el cual recluta la procaspasa-9 por su dominio de

interacción CARD. La unión de la procaspasa-9 al apoptosoma activa la capasa-9 que es capaz de cortar y activar caspasas efectoras, como la capasa-3 (Jiang and Wang, 2000; Zou *et al.*, 1999).

La regulación de estos eventos moleculares apoptóticos ocurre a través de miembros de la familia de proteínas Bcl-2. Estas proteínas regulan la permeabilidad de la membrana mitocondrial y pueden ser pro-apoptóticas o anti-apoptóticas. Algunas proteínas anti-apoptóticas son Bcl-2, Bcl-x, Bcl-X_L, Bcl-X_S, Bcl-w, BAG y algunas proteínas pro-apoptóticas incluyen Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik y Blk. Ambos tipos son muy relevantes ya que pueden determinar si la célula comienza la apoptosis o aborta el proceso (Cory and Adams, 2002).

4.2.3 La vía extrínseca de la apoptosis: el ligando de muerte TRAIL

La ruta extrínseca de la apoptosis, se caracteriza por la presencia de receptores de muerte, proteínas transmembrana que conectan las señales extracelulares inductoras de muerte con la apoptosis celular. Los receptores de muerte pertenecen a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF-R, *Tumor Necrosis Factor Receptor*) (Locksley *et al.*, 2001) y poseen un dominio extracelular rico en cisteínas y un dominio intracitoplasmático de aproximadamente 80 aminoácidos, el dominio de muerte DED, responsable de la activación del proceso apoptótico tras la unión de un ligando al receptor (Ashkenazi and Dixit, 1998). Dicho dominio juega un papel crítico en la transmisión de señales de muerte y sirve de unión para otras proteínas adaptadoras que también poseen un dominio DED.

El ligando de muerte TRAIL se identificó en 1995, por homología con el dominio C-terminal del ligando del receptor FAS (FasL) (Wiley *et al.*, 1995). Aunque es sintetizado como una proteína transmembrana, puede ser cortado en la superficie celular y liberado al medio extracelular como una proteína soluble, manteniendo su actividad. A diferencia de otros miembros de la familia TNF, la conformación biológicamente activa de TRAIL, es un homotrímero en el que el residuo de cisteína 230 unido a un átomo de zinc es esencial para su actividad (Hymowitz *et al.*, 2000). El ARNm de TRAIL está presente en la mayoría de los tejidos, aunque se expresa principalmente en células del sistema inmune (Wiley *et al.*, 1995). En células humanas, TRAIL puede interactuar con algunos de sus receptores, activando la apoptosis a través de su unión a los receptores TRAIL-R1 y TRAIL-R2 (DR4 y DR5) que presentan dominios de muerte DED, crucial para la transmisión de la señalización apoptótica. Además de estos receptores, se han identificado, al menos otros tres que compiten por su unión a TRAIL.

Actualmente se ha propuesto un modelo de señalización apoptótica mediada por TRAIL (Figura 4). El ligando de muerte TRAIL con estructura homotrimérica se une específicamente a los homo- o heterotrímeros de receptores de muerte TRAIL-R1/DR4 o TRAIL-R2/DR5 expresados en la superficie celular, induciendo la ruta apoptótica extrínseca. La trimerización de los receptores induce un cambio conformacional del DED que resulta en el reclutamiento de proteínas adaptadoras FADD, formando el complejo inductor de señales de muerte DISC. A su vez, el DED de FADD se une al DED de la procaspasa-8 y la procaspasa-10 resultando en su oligomerización y autoactivación (Kischkel *et al.*, 2000). Una vez activas las caspasas-8/-10 pueden activar directamente las caspasas efectoras o cortar a Bid para activar la ruta mitocondrial de la apoptosis (Sprick *et al.*, 2000). Así se puede decir que las células sensibles a TRAIL se pueden clasificar en tipo I o II en función de que necesiten la ruta mitocondrial de la apoptosis (células de tipo II) o no para inducir la muerte (células de tipo I) (Scaffidi *et al.*, 1998). Existen evidencias derivadas de los estudios de delección del gen que codifica para TRAIL en ratones, que indican que TRAIL endógenamente expresado por las células *natural killer*, es esencial en la

vigilancia que lleva a cabo el sistema inmune para evitar el desarrollo de tumores. Los ratones “knock-out” para el gen TRAIL muestran una mayor predisposición para el desarrollo espontáneo o inducido de metástasis tumorales (Cretny *et al.*, 2002).

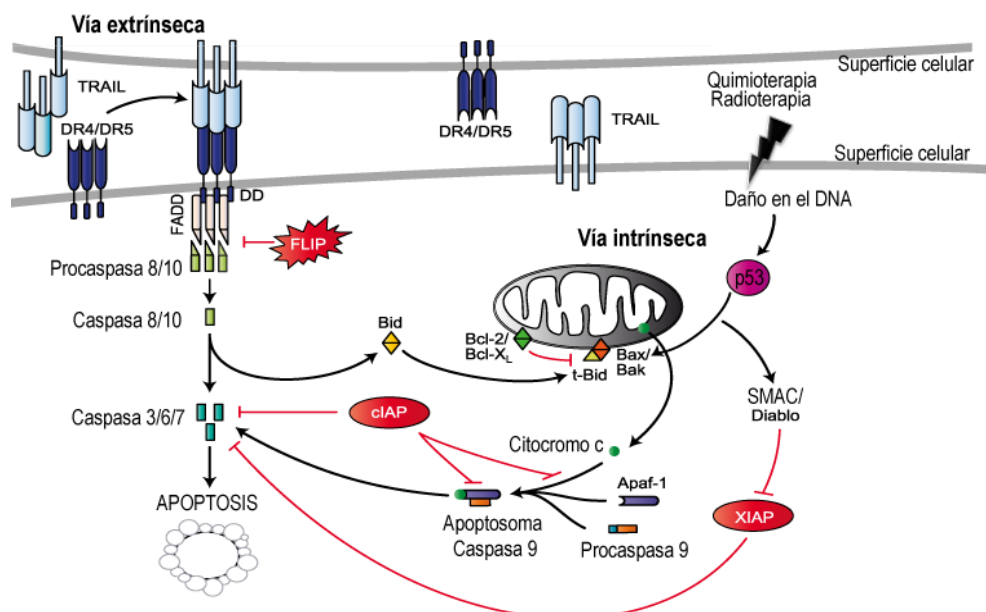


Figura 4. Representación esquemática de las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis. La inducción de la apoptosis por la vía de los receptores de muerte como TRAIL se inicia con la trimerización de TRAIL. Su unión al receptor DR4 o DR5 conlleva el reclutamiento de FADD que facilita la unión de la procaspasa-8 formando el complejo DISC. Es en este complejo donde tiene lugar la activación de la caspasa-8 (o caspasa-10). En células tipo I, la caspasa-8 (o caspasa-10) puede activar directamente las caspasas efectoras como la caspasa 3/6/7 e inducir la apoptosis. En células de tipo II, TRAIL puede inducir además la vía apoptótica mitocondrial o vía intrínseca, la caspasa-8 activa convierte Bid en tBid, el cual se transloca a la membrana mitocondrial provocando la liberación del citocromo c y de SMAC/DIABLO. El citocromo c junto con Apaf-1 pueden activar la caspasa-9, la cual a su vez activa la caspasa-3. La apoptosis inducida por la quimioterapia y la radiación tiene lugar mediante la ruta intrínseca. La proteína p53 activa las proteínas proapoptóticas de la familia de Bcl2 como Bax y Bak, cuya actividad está regulada negativamente por las proteínas antiapoptóticas de la misma familia como Bcl-2 y Bcl-XL. De la interacción de estas proteínas, por mecanismos de los que aún se conoce poco, tiene como resultado la permeabilización mitocondrial y la liberación del citocromo c y SMAC/DIABLO, llevando finalmente a la activación de la caspasa-9, la caspasa-3 y la apoptosis celular. En la regulación de los eventos apoptóticos están implicadas las proteínas FLIP e IAPs. (Adaptado de (Clarke *et al.*, 2004a)).

La capacidad de Apo2L/TRAIL para inducir apoptosis selectivamente en células transformadas y la necesidad de terapias antitumorales menos agresivas que las utilizadas actualmente, ha propiciado el desarrollo de numerosos estudios dirigidos al empleo de este ligando, como prometedor agente terapéutico en la lucha contra el cáncer (Ashkenazi *et al.*, 1999; Walczak *et al.*, 1999). A pesar de que TRAIL induce apoptosis en células tumorales y no en células normales, existen muchos tumores resistentes a la apoptosis inducida por TRAIL. La resistencia a la apoptosis inducida por TRAIL puede darse a diferentes niveles dentro de la vía de señalización: resistencia a nivel de los receptores de muerte expresados en membrana, resistencia a nivel de los componentes del DISC o resistencia a nivel de las proteínas de la familia Bcl-2 y la familia IAPs (proteínas inhibidoras de la apoptosis).

4.2.4 Señalización apoptótica por receptores tipo-Toll 3

El receptor tipo-Toll 3 pertenece a la familia de los receptores tipo-Toll (TLR), que reconocen diferentes patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y conducen a la activación de la respuesta inmune innata y a la posterior respuesta inmune adaptativa (Akira *et al.*, 2006; Iwasaki and Medzhitov, 2004). TLR3 está presente en células del sistema inmune, y en una gran variedad de células epiteliales, incluyendo células de pulmón, de útero, de la córnea, de la vagina, del cérvix, del epitelio biliar e intestinal (Akira *et al.*, 2006). El TLR3 se encuentra presente en el compartimento endosomal

dónde reconoce ARN de doble cadena (*dsRNA*), generalmente de origen viral aunque también reconoce *dsRNA* de origen sintético como el ácido poliinosínico-policitidílico [poly(I:C)] induciendo una respuesta inflamatoria a través de la activación de NF- κ B y la inducción de interferones de tipo I (Vercammen *et al.*, 2008a). TLR3 posee la estructura de proteínas transmembrana tipo I caracterizadas por presentar un ectodominio compuesto por repeticiones ricas en leucina (LRR; *Leucine Rich Domain*) responsable del reconocimiento de *dsRNA* (Bell *et al.*, 2003), un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático conservado del receptor de IL-1, conocido como dominio TIR (*Toll/IL-1 Receptor*) (Figura 5). Como otros receptores de membrana, TLR3 tiene la capacidad de inducir la apoptosis de manera dependiente del adaptador TRIF (*TIR Domain-Containing Adaptor-Inducing Interferon- β*) (Weber *et al.*, 2010). El reclutamiento y la unión de RIP1 por parte de TRIF, tal y como muestra la figura 5, tiene lugar a través del motivo RHIM (*RIP Homotypic Interaction Motif*) presente en ambas moléculas y es necesaria para la transducción de la señal apoptótica (Kaiser and Offermann, 2005; Weber *et al.*, 2010). RIP1 contiene un dominio de muerte (DD) en su extremo C-terminal por el que interacciona con la molécula adaptadora FADD (*FAS-Associated Death Domain Protein*). A su vez, FADD promueve el reclutamiento de la caspasa-8 (para revisión, ver (Vercammen *et al.*, 2008a)) a través de la interacción entre los dominios DEDs presentes en ambas proteínas. Esta plataforma de señalización inicia la inducción de la muerte celular, la cual está estrechamente regulada por las proteínas antiapoptóticas como cFLIPs o IAPs (Feoktistova *et al.*, 2011). Además y de manera dependiente de TRIF se activan otras cascadas de señalización que conducen a la activación de NF- κ B e IRF3 (*Interferon Regulatory Factor-3*) y se inicia la producción de citoquinas proinflamatorias, moléculas coestimuladoras e interferones de tipo I (Kawai and Akira, 2007). Estas cascadas de señalización y la interconexión entre ambas son responsables de una serie de respuestas celulares específicas relacionadas con la supervivencia celular, la proliferación, la inflamación y la apoptosis. Además de TLR3, el *dsRNA* es un PAMP que es reconocido por varios "sensores" citosólicos, como la proteína quinasa R, PKR, y las helicasas de ARN, denominadas RIG-1 (*Retinoic Acid-Inducible Gene 1*) y MDA-5 (*Melanoma Differentiation-Associated Gene 5*) (Gitlin *et al.*, 2006; Hornung *et al.*, 2006; Meylan and Tschopp, 2006; Yoneyama and Fujita, 2007). TLR3 y las helicasas de ARN, RIG-I/MDA-5 difieren en sus localizaciones celulares, las especificidades de ligando y sus dianas de señalización, lo que sugiere que las células poseen varios mecanismos de defensa contra la infección viral.

El papel exacto de TLR3 en la infección viral es un tema controvertido. Varios trabajos publicados han demostrado que TLR3 contribuye a la eliminación de virus específicos, sin embargo hay otros tipos de virus que se benefician de la estimulación de TLR3. TLR3 está implicado en la protección de órganos como el hígado y el sistema nervioso central. Además, se ha sugerido que TLR3 juega un papel importante en enfermedades autoinmunes como la nefritis lúpica o la diabetes tipo I. Recientemente, se ha detectado la expresión de los TLR3 en líneas celulares tumorales de mama, de colon, melanoma, etc. dónde se ha comprobado que su activación conduce a la apoptosis de las células tumorales. En las células del melanoma, TLR3 induce la activación de la señalización pro-apoptótica de manera dependiente del adaptador TRIF, el cual está bajo el control de las IAPs (Weber *et al.*, 2010). En las células β pancreáticas, el *dsRNA* induce la apoptosis dependiente de TLR3 mediante la activación de IRF3 (Dogusan *et al.*, 2008). TLR3 también induce la apoptosis de células humanas de cáncer de próstata a través de un mecanismo que depende de PKC (Paone *et al.*, 2008). TLR3 induce la apoptosis de las células de cáncer de mama humanas a través del adaptador TRIF y la señalización autocrina de los interferones de tipo I (Salaun *et al.*, 2006). Además, se ha determinado que los IFNs sensibilizan las células

endoteliales a la apoptosis inducida por *dsRNA*, y que TRAIL, DR4, DR5 y Noxa estarían implicados en la apoptosis inducida por agonistas de TLR3 en estas células (Kaiser *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2011).

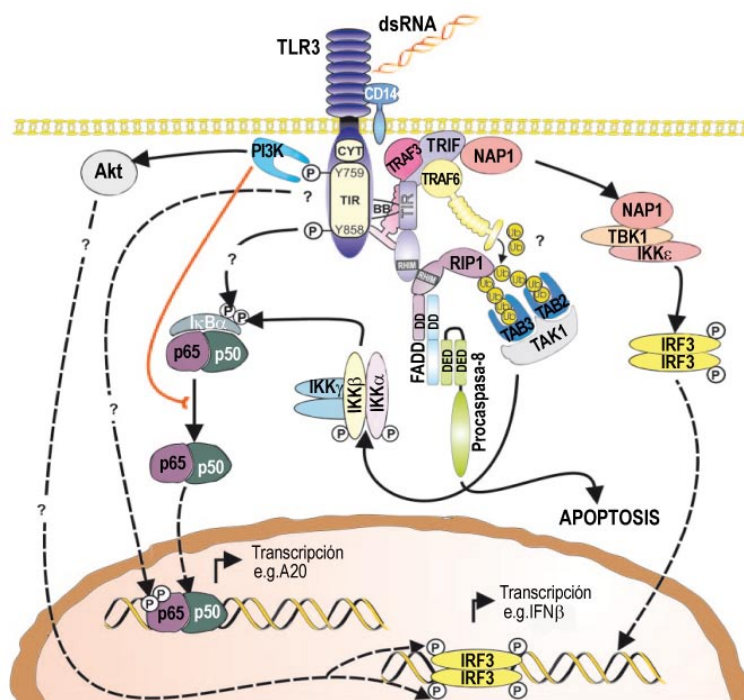


Figura 5. Representación esquemática de la vía de señalización de TLR3. La unión de *dsRNA* al complejo TLR3-CD14 induce la activación de diversos mecanismos de señalización intracelular. Este complejo TLR3-CD14 presenta en su región citoplasmática un dominio TIR que interacciona con el dominio TIR presente en la proteína adaptadora TRIF. La activación de NF- κ B e IRF3 tiene lugar mediante dos ramas de señalización que parten de la molécula adaptadora TRIF. La interacción mediante diferentes dominios de TRIF con la quinasa RIP1 o con la ligasa de ubiquitina denominada TRAF6 resulta en la poli-ubiquitinización de RIP1, que más tarde es reconocida por las proteínas receptoras de ubiquitina TAB2 y TAB3, las cuales activan la quinasa TAK1. La quinasa TAK1 activa induce la fosforilación de IKK α y IKK β , permitiendo la fosforilación y degradación del inhibidor I κ B α de NF- κ B. La liberación y translocación de NF- κ B al núcleo celular resulta en la activación de promotores específicos (e.g. A20). Además, el adaptador TRIF se une a TRAF3 y a NAP-1. Mientras que la función de TRAF3 no está aún clara, NAP-1 funciona como un adaptador de las quinasas IKK ϵ y TBK1 que poseen funciones redundantes. Ambas quinasas fosforilan a IRF3 permitiendo su dimerización y la translocación al núcleo donde induce la expresión de genes específicos como el IFN β . Mientras que las vías de señalización mediadas por TRIF tienen como resultado la activación de NF- κ B e IRF3, el estado plenamente activado de estos dos factores de transcripción depende de su estado de fosforilación. Aunque por el momento se conoce poco acerca de la señalización que conducen a estos eventos, si se sabe que la fosforilación de IRF3 depende de la quinasa Akt, que a su vez se activa por la quinasa PI3K, la cual se une al residuo fosforilado Tyr759 de TLR3. Curiosamente, PI3K también parece tener una función inhibitoria de la activación de NF- κ B, mientras que la fosforilación de TLR3 en el residuo Tyr858 aumenta la activación de NF- κ B por un mecanismo desconocido. Por otro lado, TLR3 induce la apoptosis por mecanismos dependientes de TRIF y de RIP1. El reclutamiento de RIP1 por parte de TRIF a través de los motivos RHIM presentes en ambas moléculas induce la señalización apoptótica. RIP1 contiene un dominio de muerte DD que interactúa con la molécula adaptadora FADD. A su vez FADD promueve el reclutamiento de la caspasa-8 a través de la interacción con los dominios DED presentes en ambas proteínas. La auto-activación proteolítica de la caspasa-8 inicia la apoptosis celular. Por otra parte, la fosforilación de la Tyr 759 recluta PI3K y activa Akt para la completa fosforilación y activación de IRF3. (Adaptado de (Vercammen *et al.*, 2008b)).

4.2.5 Proteínas reguladoras de la apoptosis: las proteínas FLIP e IAPs

La supervivencia celular depende de un fino equilibrio entre los factores que conducen a la apoptosis y aquellos que la inhiben. Se han caracterizado las vías de señalización y las diferentes familias de proteínas que juntas van a determinar un umbral para la inducción de la apoptosis, permitiendo que esta sea inducida sólo en respuesta a las señales apropiadas. Dos familias fueron inicialmente identificadas como reguladoras de la apoptosis, FLIP e IAPs, que tienen como función inhibir la muerte celular, principalmente inhibiendo la activación de las caspasas.

Las proteínas FLIPs (FLIP_L y FLIP_S) presentan homología con la caspasa-8 pero están desprovistas de actividad catalítica. Se comportan por tanto como dominantes negativos para la caspasa-8 y son reclutadas por el adaptador FADD a la plataforma de señalización DISC. Esta familia representa por tanto inhibidores potentes de la actividad apoptótica de

ligandos de muerte como TRAIL (Irmeler *et al.*, 1997). Debido a esta actividad inhibidora de la apoptosis, su sobre-expresión en determinado tipo de células cancerosas es responsable de la resistencia de estas ante la acción de determinados estímulos proapoptóticos como por ejemplo TRAIL (Roth and Reed, 2004).

Las proteínas de la familia IAPs, entre ellas cIAP-1, cIAP2, XIAP o la survivina pueden modular tanto la vía intrínseca como la vía extrínseca de la apoptosis (Gyrd-Hansen and Meier, 2010). Se han identificado alteraciones en las proteínas IAPs en muchos tipos de cáncer en humanos y se han asociado con quimio-resistencia, con la progresión y con el mal pronóstico de la enfermedad (Hunter *et al.*, 2007; LaCasse *et al.*, 1998). El mecanismo por el cual las IAPs inhiben la apoptosis pasa por su capacidad para inhibir la activación de las caspasas, aunque en el caso de las cIAPs, este es un tema bastante controvertido. Recientemente, se ha descrito que cIAP-1 y cIAP2 juegan un papel importante en la regulación de la señalización canónica y no canónica de NF- κ B, modulando así la muerte celular (Gyrd-Hansen and Meier, 2010). Es importante destacar que cIAPs modulan la señalización canónica y no canónica de NF- κ B en direcciones opuestas: cIAP-1 y cIAP2 son reguladores positivos de la vía canónica y suprimen de manera constitutiva la activación no-canónica de NF- κ B. Las cIAPs regulan la señalización canónica y no-canónica de NF- κ B a través de su capacidad para actuar como ubiquitina-ligasas E3. La inhibición de la señalización no-canónica de NF- κ B tiene lugar a través de la degradación constitutiva de NIK, una quinasa esencial de esta vía. Mientras cIAP-1 y cIAP2 son necesarios para inhibir la vía de señalización no-canónica de NF- κ B, son necesarios para mediar la activación de NF- κ B inducida por TNF en la vía canónica. La unión de tres moléculas de TNF a tres moléculas de TNF-R1 provoca la formación de un complejo de señalización dependiente de ubiquitina que incluye TRAF2, TRADD, TRAF5, cIAP-1, cIAP2, LUBAC y la proteína quinasa RIP1. Este complejo localizado en la membrana citoplasmática se denomina "complejo-I" (Haas *et al.*, 2009; Micheau and Tschopp, 2003). La ubiquitinación de componentes del complejo-I como RIP1 por las cIAPs, estimula a su vez el reclutamiento y la activación dependiente de ubiquitina de diferentes quinasas necesarias para la señalización de NF- κ B (Bianchi and Meier, 2009). Las cIAPs también protegen a las células de los efectos letales del TNF, en ausencia de las cIAPs el complejo-I se desprende de TNF-R1 y recluta FADD y la caspasa-8 para formar un complejo que señala a muerte celular, este complejo se denomina "complejo-II" (Petersen *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008).

Una serie de compuestos (SM, *Smac Mimetic*) que fueron originalmente diseñados para imitar la unión de la proteína mitocondrial Smac/DIABLO al motivo IBM (*IAP-Bindig Motif*) de XIAP también se unen a las cIAPs. Estos compuestos inducen la autoubiquitinación de las cIAPs y su degradación en el proteosoma y son, por tanto, considerados como antagonistas de las IAPs (Bertrand *et al.*, 2008; Gaither *et al.*, 2007; Petersen *et al.*, 2007; Varfolomeev *et al.*, 2007; Vince *et al.*, 2007). Recientemente, se ha demostrado que la degradación de cIAP-1 y cIAP2, causada por el tratamiento con SM causa la asociación espontánea de RIP1/FADD/caspasa-8. Este complejo que se forma independientemente de TNF (Micheau and Tschopp, 2003; Wang *et al.*, 2008), se denomina "Ripoptosoma". El ensamblaje del "Ripoptosoma" se basa en la actividad quinasa de RIP1 y puede causar, dependiendo del contexto celular, la muerte celular dependiente o independiente de las caspasas.

4.2.6 Que mediadores de las vías proapoptóticas utiliza el AR para ejercer sus efectos

Los mecanismos moleculares que subyacen a los efectos pro-apoptóticos del AR son poco conocidos y se cree que provienen inicialmente de su habilidad para regular la transcripción de multitud de sus genes diana. Algunas de estas

dianas son, entre otras, caspasas, proteínas Bcl-2, factores de transcripción que regulan la apoptosis, genes implicados en la fragmentación del ADN, ligandos que inducen apoptosis como TRAIL, etc.

La transducción y ejecución de la señalización apoptótica está iniciada por la activación de las caspasas. A este respecto, se ha demostrado que la caspasa-9, iniciadora de la vía apoptótica mitocondrial, es un gen diana de RAR en células tumorales de mama MCF-7. De acuerdo con la función descrita de CRABP-II de aumentar la actividad transcripcional de RAR, CRABP-II coopera con el AR para incrementar la expresión de la caspasa-9 e inducir la apoptosis (Donato *et al.*, 2007). La capacidad de los retinoides para regular la expresión de genes pro-apoptóticos, también se ha demostrado en queratinocitos. Además, en dicho contexto celular se ha señalado que el AR induce la expresión de caspasa-3, -6, -7 y -9, sensibilizando a las células a la apoptosis (Mrass *et al.*, 2004). Además de regular la expresión de las caspasas, el AR modula la expresión de proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas que inician la ruta apoptótica mitocondrial. Existen numerosas descripciones sobre la regulación de estas proteínas por el AR en diferentes contextos celulares. En el caso de las células MCF-7, el tratamiento con AR permite la activación de la proteína pro-apoptótica Bax y la liberación del citocromo c mitocondrial (Niu *et al.*, 2001), en cambio, en otras líneas de cáncer de mama, la apoptosis inducida por el AR está asociada con la disminución marcada de los niveles de proteína anti-apoptótica Bcl-2 y survivina (Pratt *et al.*, 2003). Del mismo modo, la apoptosis inducida por AR en células de neuroblastoma, entre otras, está asociada a la disminución de la expresión de Bcl-2, a la activación de la caspasa-9 y caspasa-3, y a la liberación del citocromo c al citoplasma (Niizuma *et al.*, 2006). Algunas de estas actividades pueden estar asociadas con la regulación positiva de la proteína supresora de tumores p53, como se ha demostrado en cultivos *in vitro* de cáncer de páncreas, melanoma metastásico y leucemia metastásica (Li *et al.*, 2009; Zhang and Rosdahl, 2004; Zheng *et al.*, 2000). Aunque el mecanismo molecular por el cual el AR regula la expresión de p53, no se conoce con exactitud, algunos estudios señalan que las proteínas Chmp1A y el factor de transcripción Strat13 están implicadas en la apoptosis, representando un papel importante en la señalización por AR en células tumorales (Li *et al.*, 2009; Thin *et al.*, 2007).

Por otra parte, numerosos trabajos demuestran que el AR ejerce sus efectos pro-apoptóticos induciendo la expresión de ligandos de muerte y sus receptores pertenecientes a la ruta extrínseca de la apoptosis. FasL, TNF α y TRAIL son dianas de la señalización pro-apoptótica de los retinoides. Por ejemplo, en células de leucemia aguda promielocítica, la activación de RAR por el AR induce la expresión del factor de transcripción IRF-1 (*Interferon Regulatory Factor-1*), que a su vez es capaz de regular positivamente la expresión del ligando de muerte TRAIL (Altucci *et al.*, 2001). En el caso de las células de cáncer de mama, se ha demostrado que el AR y el interferón inducen la activación de manera sinérgica de la expresión de TRAIL, el cual de manera paracrina es capaz de inducir la muerte de células T transformadas pero no de células T normales (Clarke *et al.*, 2004b). Además, se ha demostrado la implicación de la vía RAR β -HOXA5 en la inhibición del crecimiento y la inducción de la apoptosis en células de cáncer de mama (Chen *et al.*, 2007).

En células de origen gástrico, el tratamiento con 9cRA induce la translocación del heterodímero TR3-RXR a la mitocondria y la apoptosis celular (Lin *et al.*, 2004). La translocación del heterodímero formado por el receptor huérfano TR3 (NGFIB, NUR77) y RXR depende de la activación de RXR por su ligando. Así el receptor de retinoides, RXR, a través de efectos no-genómicos, puede contribuir a la inducción de la apoptosis en diferentes tipos celulares.

El AR, solo o en combinación con otros agentes, es un regulador importante de la expresión génica y numerosas evidencias indican que actúa como un potente agente antitumoral debido a su capacidad de inhibir la proliferación e inducir la diferenciación celular. En particular, el AR y los IFNs tienen potentes efectos antiproliferativos en células de cáncer de mama y en combinación actúan de manera aditiva/sinérgica para inhibir el crecimiento de células de cáncer de mama *in vitro* e *in vivo*.

Estudios previos de expresión génica en nuestro laboratorio muestran que el 9cRA, en combinación con el IFN γ , alteran drásticamente el perfil de expresión génica en las células de cáncer de mama. Entre otros, los niveles de ARNm de cIAP2 (*Proteína Inhibidora de la Apoptosis-2*) y TLR3 (*Receptor Tipo-Toll 3*) aumentan tras el tratamiento con 9cRA, solo o en combinación con IFN γ , en diversos sistemas celulares de cáncer de mama estudiados.

Basándonos en estos antecedentes, los objetivos propuestos para el desarrollo de esta Tesis Doctoral fueron los siguientes:

1. Analizar la regulación de la expresión de cIAP2 por el 9cRA, solo o en combinación con el IFN γ , en un panel de líneas celulares de cáncer de mama, así como determinar la implicación de cIAP2, un gen previamente identificado como un gen anti-apoptótico, en los efectos inducidos por el 9cRA, solo o en combinación con IFN γ en la línea celular SK-BR-3.
2. Analizar la relación existente entre el AR y el receptor TLR3, estudiando los efectos a nivel de proliferación y apoptosis celular de tratamientos combinados entre el AR y agonistas para TLR3, como es el ácido poliinosínico-policitidílico, así como determinar los mecanismos moleculares que subyacen a los efectos inducidos por estos agentes en células de cáncer de mama.

1. Reactivos

Los tratamientos con el 9cRA fueron realizados a una concentración de 10^{-6} M (Sigma) en todos los experimentos, a menos que se mencione específicamente otra concentración en el pie de la figura correspondiente. Como control en estos experimentos se trataron las células con el volumen equivalente de etanol (vehículo). El IFN γ (SIGMA) se diluyó en medio de cultivo siguiendo las recomendaciones del fabricante y se utilizó a la concentración de 15 ng/ml. El inhibidor de la síntesis de proteínas cicloheximida (CHX) fue suministrado por Sigma y se utilizó a 2.5 μ g/ml disuelto en DMSO. Los análogos sintéticos de ARN de doble cadena, el ácido poliinosínico-policitidílico [poly(I:C)] y el ácido poliadenílico-poliuridílico [poly(A:U)] (Invivogen) fueron disueltos en agua. Las dosis de poly(I:C) empleadas fueron de 12.5 μ g/ml para la línea celular ZR-75-1 y de 50 μ g/ml para el resto de líneas celulares utilizadas en el estudio, a menos que se indique otra concentración en la figura. La concentración de poly(A:U) utilizada fue de 100 μ g/ml. El IFN β , suministrado por Sigma, fue empleado a las concentraciones que se detallan en la figura correspondiente.

2. Anticuerpos

Los anticuerpos primarios y secundarios usados en este estudio, así como su origen y la concentración utilizadas están indicados en la siguiente tabla 1 (Tabla 1).

La neutralización del receptor de interferón de tipo I (IFNR1) se llevó a cabo mediante un anticuerpo monoclonal de ratón, clon denominado MMHAR-2, obtenido del proveedor PBL Interferon Source. Este anticuerpo fue utilizado a una concentración de 20 μ g/ml. En las mismas condiciones y concentración se utilizó como control negativo una IgG de ratón (Sigma cat #I8765).

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios.

Anticuerpo primario	Especie		Dilución	Proveedor
	Monoclonal	Policlonal		
clAP2 (AF8171)	Ratón	Cabra	1:1000	R&D Systems
TLR3 (MAB1487)			1:250	R&D Systems
IRF3 (#4302)		Conejo	1:1000	Cell Signaling
p-IRF3 (#4947)		Conejo	1:1000	Cell Signaling
TRAIL (AF375)		Cabra	1:1000	R&D Systems
I κ B α (#sc-371)		Conejo	1:1000	Santa Cruz
Caspasa-3 (#9661)		Conejo	1:1000	Cell Signaling
Caspasa-8 (#9496)	Ratón		1:1000	Cell Signaling
β -actina-HRP (A 3854)	Ratón		1:10000	Sigma
Anticuerpo secundario	Conjugado		Dilución	Proveedor
Anti-Rabbit IgG (#7074)	Peroxidasa		1:2000	Cell Signaling
Anti-Mouse IgG (#7076)	Peroxidasa		1:2000	Cell Signaling
Anti-Goat IgG (#sc-2056)	Peroxidasa		1:2000	Santa Cruz

3. Cultivos celulares

Las líneas celulares tumorales humanas utilizadas en este estudio se detallan en la Tabla 1 y fueron obtenidas de la ATCC o suministradas amablemente por diversos laboratorios del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO, Madrid). Todas las líneas celulares son adherentes y crecen en monocapa. Los medios de cultivo utilizados (Tabla 2) se suplementaron con 10% de suero fetal bovino (Gibco) y 2 mM L-glutamina (Gibco). Todas las células fueron cultivadas bajo una atmósfera de 5% CO₂ y 37°C con 95% de humedad saturante. Las células fueron regularmente analizadas para detectar la presencia de micoplasmas utilizando un *kit* comercial.

Tabla 2. Origen y medio de cultivo de las líneas celulares tumorales utilizadas en este estudio.

Línea celular	Tejido de procedencia	Medio de cultivo
SK-BR-3	Adenocarcinoma de mama	DMEM
ZR-75-1	Carcinoma de mama ductal	RPMI
T47-D	Carcinoma de mama ductal	RPMI; 0,6 µg/ml insulina
H3396	Adenocarcinoma de mama	RPMI
Hs 578T	Carcinoma de mama	DMEM; 0,01µg/ml insulina
MCF-7	Adenocarcinoma de mama	DMEM
BT-474	Carcinoma de mama	DMEM; 0,01µg/ml insulina
HCC-1937	Carcinoma primario ductal de mama	RPMI
MDA-MB-231	Adenocarcinoma de mama	DMEM
MDA-MB-157	Carcinoma medular de mama	DMEM
MDA-MB-436	Adenocarcinoma de mama	Ham's F12:DMEM
HeLa	Adenocarcinoma de cérvix	DMEM
HT-29	Adenocarcinoma de colon	RPMI
Hep-G2	Carcinoma hepático	RPMI

4. Ensayos de *Western Blot*

Los extractos celulares de proteínas totales fueron realizados de la siguiente manera: las células fueron lavadas dos veces con PBS 1X (tampón fosfato salino) frío. Posteriormente, y tras eliminar totalmente el PBS, las células se lisan durante 5 minutos a 4°C en el Tampón de Lisis de Tritón (TLB), que contiene 20 mM Tris pH 7.4, 137 mM NaCl, 2 mM EDTA, 25 mM β-glicerofosfato, 1% Tritón X-100, 1 mM Ortovanadato de Sodio, 2 mM Pirofosfato de Sodio, 10% Glicerol, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Aprotinina, 10 µg/ml Pepstatina, 10 µg/ml Leupeptina. Los lisados celulares se centrifugan a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se recoge el sobrenadante y se mide la concentración de proteínas por el Método de Bradford siguiendo las indicaciones del proveedor. Los lisados celulares se diluyen en la solución de Laemmli hasta obtener una concentración final 1X, a continuación se hierven durante 5 minutos y las proteínas son separadas mediante electroforesis en geles de SDS. Posteriormente, las proteínas son transferidas a membranas de nitrocelulosa. Las membranas son incubadas en la solución de bloqueo (5% leche desnatada en 1X TBS (Tampón Tris salino), 0.1% Tween-20) durante 1 h a

temperatura ambiente y a continuación, se incubó con el anticuerpo apropiado diluido en la solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C, según indica la tabla 1. A continuación, las membranas se incuban con la solución de lavado (TBS 1X, 0.1% Tween 20) durante 5 minutos (este lavado se repite cinco veces). Finalmente, la membrana se incubó con un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa diluido en solución de bloqueo durante al menos 1h a temperatura ambiente. Las membranas se incuban con la solución de lavado (TBS 1X, 0.1% Tween 20) durante 5 minutos (este lavado se repite cinco veces). Finalmente, la unión del anticuerpo se visualiza utilizando el *kit* de quimioluminiscencia *ECL™-Western Blotting Detection Reagents* (Amersham GE Healthcare) siguiendo las recomendaciones del proveedor. En todas las figuras, la imagen que se muestra pertenece a un experimento representativo realizado al menos tres veces.

5. Extracción de ARN total y RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR)

El ARN total fue aislado usando el reactivo *Tri Reagent* (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad del ARN aislado fue analizada mediante electroforesis en gel de agarosa 1.2% (m/v) y su posterior tinte con *SYBR® Safe DNA gel stain* (Invitrogen). Posteriormente, el ARN extraído fue cuantificado con un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies). Un microgramo de ARN total de cada muestra fue utilizado para generar ADN de cadena sencilla (ADNc) utilizando el reactivo *iScript™cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad), siguiendo las indicaciones del proveedor. Los niveles relativos de los genes de interés en las muestras de ADNc generadas fueron determinados por qPCR utilizando el reactivo *FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) Mix* de Roche en el termociclador Mx3005P (Stratagene). Las condiciones para la reacción de qPCR fueron las siguientes: un único ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 repeticiones del siguiente ciclo: desnaturalización a 95°C durante 30 segundos y anillamiento y extensión a 60°C durante 1 minuto. Cada medida se realiza siempre por duplicado (dos reacciones de qPCR de la misma muestra de RT) y siempre se tienen al menos dos réplicas por condición experimental en cada experimento, así la media de las réplicas de PCR es considerada como la Ct (del inglés *threshold cycle*, ciclo umbral) de la muestra en particular. Las medidas de los niveles de expresión génica obtenidos se normalizaron con respecto a los niveles de expresión de los genes 18S ARNr o β -actina. Finalmente, los valores obtenidos en cada tratamiento se referencian a los valores obtenidos en la condición control para conocer la expresión relativa.

Las secuencias de los cebadores específicos utilizados en este estudio fueron diseñados utilizando los programas informáticos MacVector (<http://www.macvector.com/>) y Amplify (<http://engels.genetics.wisc.edu/amplify/>).

Los oligonucleótidos (Tabla 3) fueron sintetizados por Invitrogen. En todos los casos, las secuencias de tanto el cebador directo como el inverso pertenecen a exones distintos, evitando la amplificación del ADN genómico que pudiesen contener las muestras de ARN. Los cebadores fueron testados por RT-PCR convencional para comprobar que se amplificaba un solo amplicón del tamaño correcto y testados por qPCR para comprobar la ausencia de artefactos procedentes de la formación de dímeros de cebadores (*primer-dimers*) y asegurarnos que la cuantificación tenía lugar en el rango lineal. En cada experimento de qPCR, se determinó la curva de disociación para cada gen analizado con el fin de confirmar la especificidad del producto.

Tabla 3: Oligonucleótidos empleados en los experimentos de qPCR.

Gen	Cebador directo	Cebador reverso
clAP2	5'-AGCTGAAGCTGTGTTATATGAGC-3'	5'-ACTGTACCCTTGATTGTACTCCT-3'
18S	5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3'	5'-CAGATTCCGAATGCTTGTGTTTG-3'
β-actina	5'-AACTCCATCATGAAGTGTGACG-3'	5'-GATCCACATCTGCTGGAAGG-3'
TRAIL	5'-AGTGAG AGAAAG AGGTCCTCA G-3'	5'-CCAGAGCCTTTTCATTCT TGG A-3'
TLR3	5'-AAGAGTTTTCTCCAGGGTGT-3'	5'-CAGATTCCGAATGCTTGTGTTTG-3'
MDA-5	5'-ACCAAATACAGGAGCCATGC-3'	5'-CGTTCTTTCGATTTCCTTC-3'
RIG-1	5'-TGGACCATGAGTACCAACCA-3'	5'-GCCACACCAACTTCAACCTT-3'
PKR	5'-TGGAAAGCGAACAAGGAGTAAG-3'	5'-CCATCCCGTAGGTCTGTGAA-3'
IFNβ	5'-ATGACCAACAAGTGTCTCCTCC-3'	5'-GCTCATGGAAAGAGCTGTAGTG-3'
IL-8	5'-AAGACATACTCCAAACCTTCCACC-3'	5'-AAAATTCTCCACAACCCTCTGC-3'
ccl-5	5'-CGCTGTCATCCTCATTGCTACTG-3'	5'-GCAGGGTGTGGTGTCCGAG-3'
cxcl-10	5'-CTGAAAGCAGTTAGCAAGGAAAGG-3'	5'-GGGAAGTGATGGGAGAGGCAG-3'
FAS	5'-GGCATCTGGACCCTCCTACCTC-3'	5'-CAGTCTGGTTCATCCCCATTGAC-3'

6. Construcciones de plásmidos

Los vectores reporteros utilizados en los experimentos de transfección transitoria fueron generados en nuestro laboratorio de la siguiente manera: se amplificó por PCR a partir de ADN genómico humano un fragmento de 1.4 kb correspondiente a la región 5' adyacente al gen *clAP2* y se subclonó en los sitios *NcoI* y *XhoI* del plásmido básico reportero luciferasa, pGL3-Luc. Una serie de deleciones en 5' de este fragmento fueron amplificadas por PCR utilizando diferentes cebadores directos que contienen un sitio *XhoI* en su extremo 5' y un cebador inverso común que contiene un sitio *NcoI* en su extremo 5'. Los fragmentos de ADN que resultaron de la amplificación por PCR fueron digeridos con las enzimas de restricción *XhoI* y *NcoI*, posteriormente fueron purificados por gel y ligados a los respectivos sitios en el vector pGL3-Luc. La mutagénesis dirigida del promotor *clAP2* se realizó utilizando el *kit QuickChange Site-Directed Mutagenesis* de Stratagene siguiendo las instrucciones del proveedor. La secuencia de nucleótidos se verificó mediante la secuenciación automática del ADN. El tamaño de los fragmentos clonados así como los sitios mutados aparecen descritos en la figura 9 y en la referencia (Jimenez-Lara *et al.*, 2010). Como control interno de la eficiencia de la transfección, se utilizó el vector CMV-Renilla que contiene el gen reportero *Renilla reniformis* bajo el control del promotor constitutivo del citomegalovirus.

7. Transfecciones celulares y ensayos de luciferasa

En los ensayos de transfección transitoria de células SK-BR-3, las células fueron sembradas por triplicado 16 h antes de la transfección a una densidad de $1 \cdot 10^5$ células/pocillo en placas de 24 pocillos y transfectadas usando el reactivo de

transfección FUGENE (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada pocillo fue transfectado con 395 ng de ADN plasmídico correspondiente a los vectores reporteros que contienen distintas versiones del promotor cIAP2 unido al gen luciferasa (Luc) junto con 5 ng del vector CMV-Renilla (RLuc) descrito anteriormente. Después de 24 h de transfección, se retiraron los complejos de transfección y las células fueron tratadas en medio de cultivo con etanol (vehículo), 1 μ M de 9cRA, 15ng/ml de IFN γ o 9cRA e IFN γ durante 48 h. La actividad luciferasa y renilla se determinó utilizando el reactivo *Dual Luciferase™ Reporter Assay System* (Promega), según las indicaciones del fabricante en un luminómetro GLOMAX® 96-microplate Reader Luminometer (Promega). La actividad luciferasa fue normalizada con respecto a la actividad renilla (Luc/RLuc). Los resultados para cada tratamiento aparecen en las gráficas de las distintas figuras relativos al tratamiento con el vehículo.

8. Ensayos de silenciamiento génico mediante ARN de interferencia

Las células de cáncer de mama SK-BR-3 fueron sembradas (350.000 células/pocillo) en placas de seis pocillos en medio completo 24 h antes de ser transfectadas con 100 nM ON-TARGETplus SMARTpool (Dharmacon, Thermo) de los siRNAs CONTROL (cat#L-007745-00-0005), TLR3 (cat#L-007745-00), IRF3 (cat#L-006875-00) y TRAIL (cat#L0011524-00) utilizando el agente de transfección DharmaFECT-2 de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Después de 16 h en presencia de los complejos de transfección, se retiró el medio que contiene los complejos y este fue remplazado por medio completo. Las células fueron incubadas durante un periodo de recuperación de 72 h antes de ser tratadas con 1 μ M de 9cRA en presencia o ausencia de 50 μ g/ml de poly(I:C) o en su caso el vehículo control durante 24 h.

9. Ensayos de proliferación celular

Las células tumorales fueron sembradas en placas de 24 pocillos siguiendo las recomendaciones de la ATCC para cada tipo celular. Tras el tratamiento correspondiente, se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células dos veces con PBS 1X. A continuación, las células adheridas a la placa se fijan con glutaraldehído al 1% durante 10 minutos. Una vez que las células están fijadas, se retira la solución y se lavan con PBS 1X. Posteriormente, las células fijadas se tiñen con una solución al 0.1% de cristal violeta en agua desionizada durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se lavan los pocillos con agua desionizada y una vez secos se extrae el colorante fijado con una solución de ácido acético al 10% en agitación suave. La densidad óptica de las muestras es medida a 590 nm. Cada muestra es cuantificada por triplicado y cada experimento contiene al menos tres réplicas experimentales para cada tratamiento. Finalmente, la media de los valores obtenidos para cada condición experimental es expresada con respecto a la media de los valores obtenidos para la condición control (vehículo) que es fijada en 100.

10. Ensayos de muerte celular

La población celular hipodiploide fue cuantificada mediante tinción con ioduro de propidio (IP) y análisis por citometría de flujo y fue considerada como una medida de la muerte celular. Brevemente, después de sembrar y tratar las células tal y como se indica en los pies de las figuras, los medios de cultivo que contienen las células despegadas del sustrato por acción de los distintos tratamientos son recogidos en tubos de polipropileno. Las células adheridas a la placa son lavadas con PBS 1X (que también es recogido) y tripsinizadas (usando TrypLE™ Express, Invitrogen). Las células tripsinizadas

son añadidas al correspondiente tubo que contiene los medios de cultivo con las células en suspensión. Las células son centrifugadas a 1000 rpm durante 10 minutos y tras eliminar el sobrenadante, son resuspendidas en solución hipotónica (0.1% Tritón X-100, 0.1% Citrato sódico, 50 µg/ml Ioduro de propidio (Sigma) y 50 µg/ml de RNasa A) e incubadas durante una noche a 4°C protegidas de la luz. Los lisados celulares son analizados por citometría de flujo en un FACScan (BD Biosciences) con el programa informático *Cell Quest Pro*.

11. Análisis estadístico

Los valores representados en las diferentes gráficas de este trabajo están expresados como la media aritmética \pm la desviación estándar (SD) de los datos analizados. La significancia estadística se evaluó mediante el test *t de Student* utilizando el programa informático Microsoft Excel 2007. A menos que se indique de otra manera, todas las comparaciones se realizaron con respecto a los valores control. Las diferencias se consideraron significativas si * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$. En el caso de que $p > 0.05$, las diferencias fueron consideradas no significativas.

1. Implicación del gen antiapoptótico cIAP2 en los efectos antiproliferativos inducidos por el 9cRA y el IFN γ en las células SK-BR-3

1.1. El 9cRA, solo o en combinación con el IFN γ , induce la expresión de cIAP2 a nivel de ARNm y de proteína

Un gran número de estudios han descrito que el AR inhibe el crecimiento de células de cáncer de mama en cultivo, un proceso que implica tanto la inducción de la parada en el ciclo celular como la apoptosis. Desde hace mucho, se conoce también que el AR y el IFN, en combinación, actúan de manera aditiva/sinérgica para inhibir el crecimiento de células de cáncer de mama *in vitro* e *in vivo* (Fanjul *et al.*, 1996; Lindner *et al.*, 1997; Marth *et al.*, 1986; Marth *et al.*, 1993; Marth *et al.*, 1987; Widschwendter *et al.*, 1996; Widschwendter *et al.*, 1997b). En primer lugar, en el inicio de este estudio quisimos validar estos datos de la literatura en los sistemas celulares que manejábamos en el laboratorio y así, analizamos el crecimiento de tres líneas celulares de cáncer de mama (SK-BR-3, MCF-7 y ZR-75-1), y otras tres de diferente origen, una de cáncer de cérvix (HeLa), una de cáncer de colon (HT29) y una de cáncer hepático (HepG2) tras el tratamiento con el 9cRA, el IFN γ o la combinación de ambos durante 48 h (Figura 6). Como se observa en la figura 6, el tratamiento con el 9cRA inhibe la proliferación en la mayoría de las líneas tumorales estudiadas, sin embargo el efecto inhibitorio del IFN γ a la dosis elegida es despreciable en las líneas celulares de cáncer de mama pero notable en algunas de las líneas que no son de cáncer de mama como HeLa o HT-29. El tratamiento combinado con los dos agentes inhibe la proliferación de manera más pronunciada que cada uno por separado en la mayoría de las diferentes líneas celulares estudiadas.

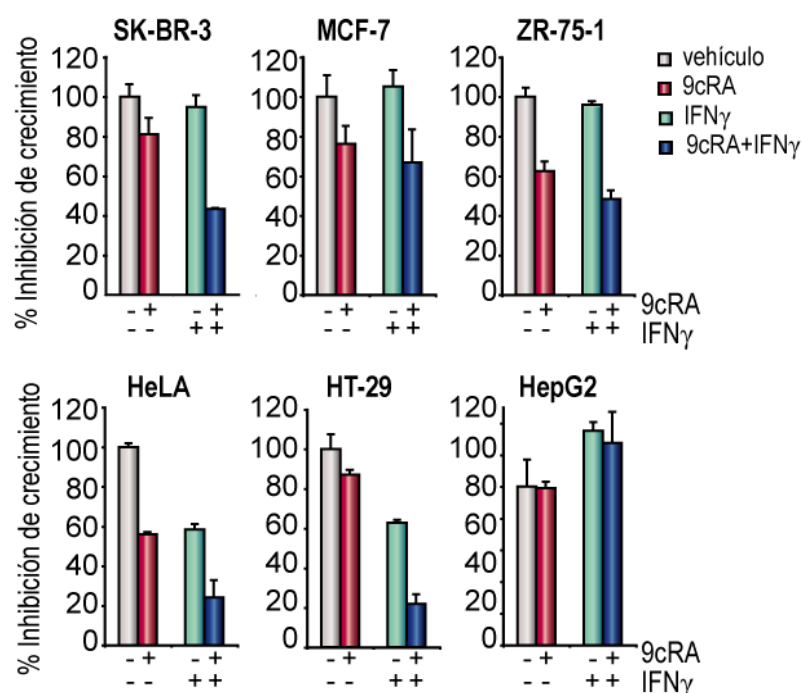


Figura 6. Efectos antiproliferativos del 9cRA, solo o en combinación con el IFN γ en diferentes líneas celulares tumorales. Análisis del crecimiento celular mediante la tinción con el colorante básico cristal violeta de las diferentes líneas celulares indicadas, tras el tratamiento con 9cRA 1 μ M, y/o IFN γ 15ng/ml por 48h. Los datos representan la media \pm SD de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Actualmente, existe un gran interés en desvelar el mecanismo molecular que subyace a los efectos antiproliferativos inducidos por la combinación del AR y los IFNs en células de cáncer de mama con el fin de mejorar sus efectos terapéuticos. Recientemente, se han identificado las proteínas GRIMs (*Gene Associated with Retinoid-IFN-Induced*

Mortality) (Lindner *et al.*, 2002; Lufe *et al.*, 2003), y XAF-1 (*X-Linked Inhibitor of Apoptosis Associated Factor 1*) (Liston *et al.*, 2001) como posibles factores mediadores del efecto antitumoral de la combinación del AR y los IFNs. Por otra parte, se ha descrito que esta combinación de agentes induce la expresión del ligando de muerte TRAIL en células de cáncer de mama, sin embargo y hasta el momento no está clara su implicación en sus efectos antitumorales (Clarke *et al.*, 2004b). Estudios previos de nuestro grupo, analizando el perfil de expresión génica inducido por el 9cRA en combinación con el IFN γ en la línea celular de cáncer de mama SK-BR-3, muestran la regulación de la expresión de genes que afectan a alrededor de 20 vías de transducción de señales diferentes (datos no mostrados) que se asocian con diversos procesos celulares como la adhesión celular, la presentación de antígenos, la apoptosis, etc. Aproximadamente, dos tercios de estas vías presentan genes cuya expresión se induce por el 9cRA en combinación con el IFN γ , mientras que un tercio de estas vías presentan genes cuya expresión es inhibida por el tratamiento con el 9cRA e IFN γ . Uno de estos genes cuya expresión se ve inducida por el tratamiento mencionado es cIAP2, que codifica por la proteína inhibidora de la apoptosis-2, cuyos niveles de ARNm aumentaron en el *array* con respecto a las condiciones control 16.63 veces tras 24 h de tratamiento.

Para validar la inducción de la expresión de cIAP2 por el 9cRA y el IFN γ encontrada en los *arrays* de expresión, analizamos los niveles de ARNm y de proteína de cIAP2 en células SK-BR-3 tras el tratamiento con el 9cRA y/o el IFN γ , mediante RT-qPCR y *western blot*, respectivamente (Figura 7).

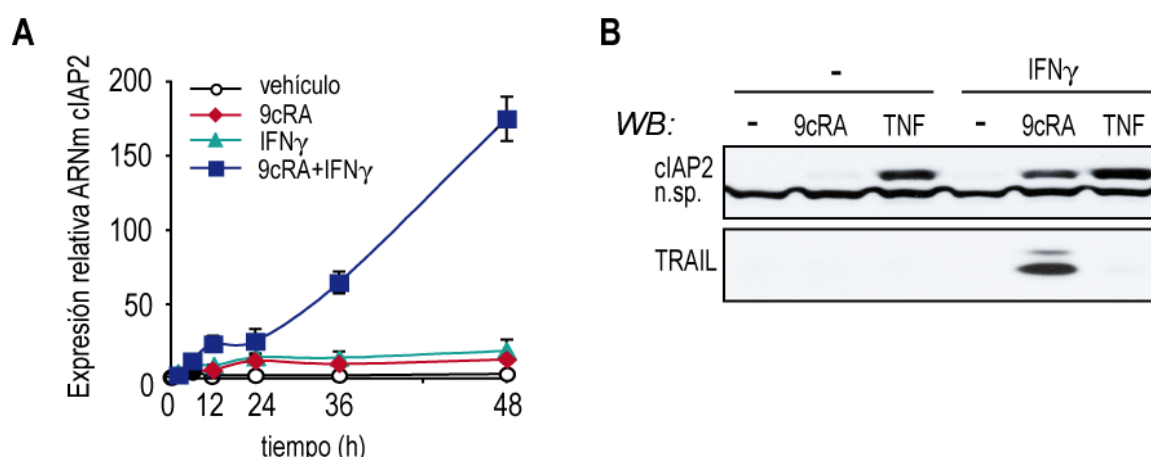


Figura 7. El 9cRA y el IFN γ inducen de manera sinérgica la expresión de cIAP2 en la línea celular de cáncer de mama SK-BR-3. **(A)** Análisis de los niveles de ARNm de cIAP2 en las células SK-BR-3 tratadas con el 9cRA y/o el IFN γ a diferentes tiempos mediante RT-qPCR. La expresión de cIAP2 fue normalizada con respecto a la expresión de la β -actina. Los datos representan la media \pm SD de un experimento representativo de tres independientes realizados por duplicado. **(B)** Análisis por *Western Blot* de extractos totales de células SK-BR-3 tratadas como se indica durante 48 h con anticuerpos anti-cIAP2 y anti-TRAIL. La señal no específica (n.sp.) es utilizada para confirmar la igualdad de carga. Los tratamientos con TNF α fueron realizados a 10 ng/ml. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados en días diferentes.

El análisis de los niveles de ARNm tras el tratamiento por el 9cRA y/o el IFN γ a diferentes tiempos muestra como el 9cRA induce la expresión de cIAP2 de manera progresiva hasta alcanzar alrededor de 12-14 veces a las 12h para luego estabilizarse, algo que se asemeja a la inducción de la expresión de cIAP2 encontrada tras el tratamiento con IFN γ , sin embargo en el caso del tratamiento conjunto, la inducción aumenta gradualmente, alcanzando alrededor de 65 y 175 veces, a las 24 y 48 h, respectivamente (Figura 7A). El análisis por *western blot* de extractos totales de células SK-BR-3 tratadas como se indica en la figura 7B muestran como los niveles de proteína de cIAP2 inducidos por el 9cRA o por el IFN γ no son detectables en estas condiciones de experimentación, sin embargo, el tratamiento con los dos agentes induce

de manera sinérgica los niveles de cIAP2 en la célula, la inducción obtenida es comparable a un reconocido inductor de la expresión de cIAP2 como es el Factor de Necrosis Tumoral (TNF) (Figura 7B). La figura 7B muestra además la inducción sinérgica del ligando de muerte TRAIL por estos dos agentes como había sido descrito anteriormente en este sistema celular (Clarke *et al.*, 2004b), lo que nos sirve como control de que el sistema celular analizado responde tal y como se ha descrito al 9cRA y el IFN γ , y pone en evidencia la inducción paralela de genes pro-apoptóticos y anti-apoptóticos por parte de esta combinación de agentes.

Para saber si la expresión de cIAP2 por 9cRA e IFN γ tenía lugar en otros sistemas celulares de cáncer de mama, analizamos las líneas celulares T47-D, ZR-75-1, H3396 y Hs578-T y encontramos perfiles de inducción similares al descrito para SK-BR-3 (Figura 8). Estos resultados sugieren que el potente efecto antiproliferativo de tratamientos combinados con el 9cRA y el IFN γ correlaciona paradójicamente con la inducción concomitante de la expresión de genes pro-apoptóticos (TRAIL) y genes anti-apoptóticos (cIAP2) (Clarke *et al.*, 2004b; Jimenez-Lara *et al.*, 2010).

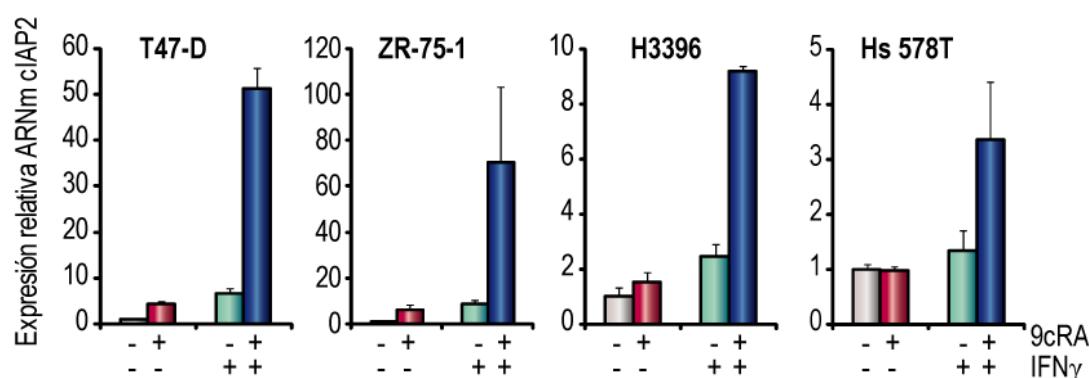


Figura 8. El 9cRA y el IFN γ inducen de manera sinérgica la expresión de cIAP2 en diferentes líneas celulares de cáncer de mama. Análisis mediante RT-qPCR de la expresión de cIAP2 después del tratamiento con el 9cRA y/o el IFN γ de las líneas celulares de cáncer de mama T47-D, ZR-75-1, H3396 y Hs 578T. Los valores obtenidos fueron normalizados con respecto a la expresión del gen de la β -actina. Los datos representan la media \pm SD de un experimento representativo de tres independientes realizados por duplicado.

1.2. Caracterización de los elementos de respuesta del promotor cIAP2 que median la activación transcripcional por el 9cRA y el IFN γ en células de cáncer de mama SK-BR-3

Previamente, nuestro grupo ha descrito que el 9cRA activa la transcripción de cIAP2, principalmente a través de los elementos de respuesta NF- κ B e induce el reclutamiento *in vivo* de p65 y RAR al promotor de cIAP2 (Jimenez-Lara *et al.*, 2010).

Para conocer si la regulación de la expresión de cIAP2 por el 9cRA y el IFN γ tiene lugar a nivel transcripcional, realizamos experimentos de transfección transitoria en células SK-BR-3 de construcciones que contienen el fragmento -1441 a +55 del promotor del gen cIAP2 dirigiendo la transcripción del gen que codifica por la enzima luciferasa. Estos experimentos muestran que el fragmento del promotor de cIAP2 analizado contiene elementos de respuesta que median una ligera inducción de la transcripción por el 9cRA (tal y como estaba descrito), el IFN γ induce ligeramente la activación de la transcripción de este fragmento del promotor y el tratamiento combinado con los dos agentes induce la actividad transcripcional del promotor de cIAP2 de manera sinérgica, tal y como ocurría cuando analizábamos en las mismas condiciones de tratamiento los niveles de ARNm para el gen cIAP2 (Figura 9B). En segundo lugar, y con objeto de conocer cuál de los elementos de respuesta presentes en el promotor de cIAP2 es responsable del sinergismo observado entre el

9cRA y el IFN γ en la activación de la transcripción del promotor del gen cIAP2, realizamos experimentos de transfección transitoria en células SK-BR-3 de construcciones que contienen diversas deleciones del promotor del gen cIAP2 dirigiendo la transcripción del gen testigo luciferasa (Figura 9A).

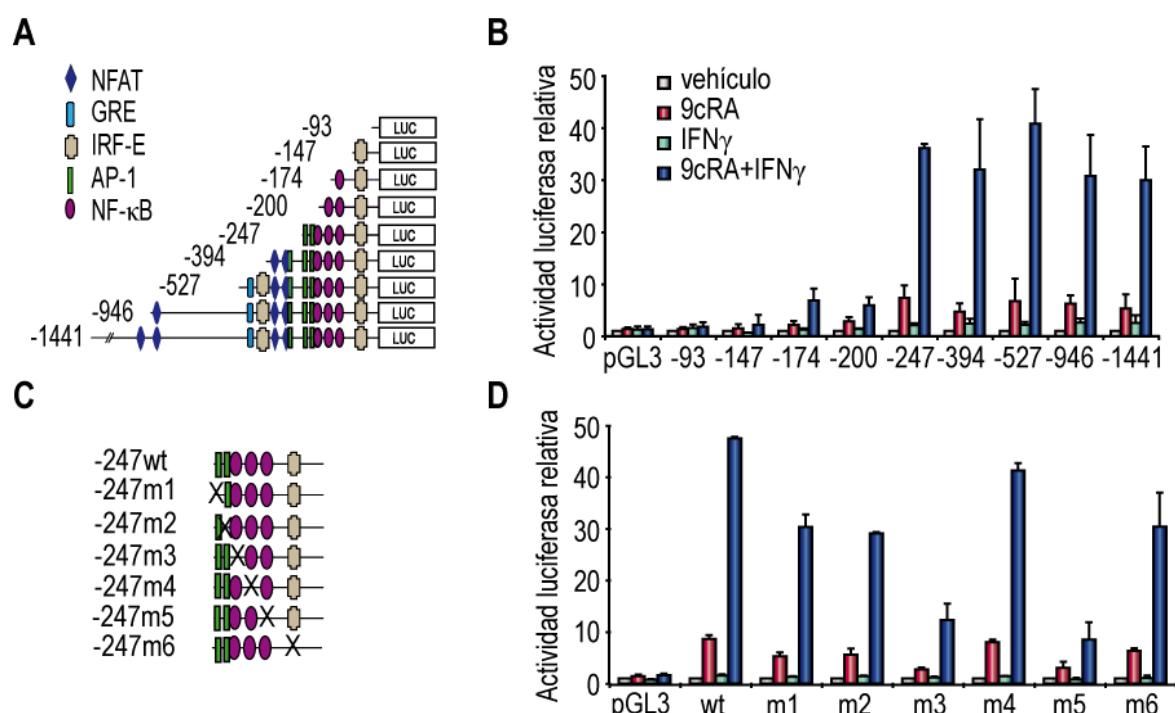


Figura 9. El 9cRA y el IFN γ activan la transcripción de cIAP2 a través de elementos de respuesta a NF- κ B. **(A)** Esquema de las construcciones reporteras que contienen diversos fragmentos de deleción del promotor de cIAP2. **(B)** Actividad luciferasa relativa en las células SK-BR-3 transfectadas transitoriamente con las construcciones del gen reportero del promotor cIAP2 indicadas en (A), y posteriormente tratadas 48 h con el vehículo, 9cRA, IFN γ o 9cRA e IFN γ . La actividad luciferasa fue normalizada con respecto a la actividad renilla y expresada como veces de inducción sobre el tratamiento con el vehículo. Los datos mostrados representan la media \pm SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado. **(C)** Esquema de los mutantes que contienen mutaciones puntuales en los diferentes elementos de respuesta del promotor -247-cIAP2. **(D)** Actividad luciferasa en las células SK-BR-3 transfectadas transitoriamente con las construcciones que se indican en el apartado (C) y posteriormente tratadas 48 h con el vehículo, 9cRA, IFN γ o 9cRA e IFN γ . La actividad luciferasa fue normalizada con respecto a la actividad renilla y expresada en veces de inducción sobre el tratamiento con el vehículo. Los datos mostrados representan la media \pm SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Tal y como ha sido descrito, el fragmento -1441/+55 contiene entre otros un elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE), en la posición -514, cuatro sitios de unión de los Factores Nucleares de Células T Activadas (NFAT), en las posiciones -1086, -821, -354, -301, tres potenciales sitios AP-1 (*Activator Protein-1*), en las posiciones -294, -233, -220, dos elementos de respuesta a IFN (IRF-E) en las posiciones -475 y -130, y tres sitios de unión a NF- κ B, en las posiciones -210, -197 y -147 (Hong *et al.*, 2000). Sin embargo, no se han descrito elementos de respuesta al AR (RAREs) en el fragmento más largo del promotor de cIAP2 analizado. El mapeo del promotor realizado limitó inicialmente los elementos que median la respuesta al 9cRA y el IFN γ a los 174pb proximales del promotor, que contienen además de la caja TATA, un elemento de respuesta al interferón o IRF-E, y el sitio NF- κ B más proximal (Figura 9B). Este fragmento del promotor presenta 6 veces de inducción por la combinación 9cRA/IFN γ , similar al encontrado en la construcción -200-cIAP2-Luc, la cual contiene un sitio NF- κ B adicional. Sin embargo, la inducción por 9cRA/IFN γ de la construcción -247-cIAP2-Luc que contiene el sitio IRF-E, los tres sitios de unión para NF- κ B y dos potenciales sitios de unión para el factor AP-1 fue significativamente más alta (alrededor de 40 veces), lo que sugiere un potencial papel de algunos de estos sitios en la

magnitud de la respuesta a 9cRA/IFN γ . No se observaron variaciones cuando comparamos la actividad transcripcional entre la construcción que contiene el fragmento -247 y fragmentos más largos del promotor. Curiosamente, observamos que la inducción de la transactivación por 9cRA de los fragmentos del promotor de cIAP2 analizados mimetiza las observadas para la combinación 9cRA/IFN γ aunque son de menor magnitud. La inducción por IFN γ de la actividad transcripcional de las construcciones que portan los fragmentos más largos fue alrededor de 2 veces (-1441, -946, -527, -394, -247), y no se observa inducción alguna en el resto de las construcciones analizadas (-200, -174, -147, -93). Sorprendentemente, la inducción de la actividad transcripcional de la construcción -147-cIAP2-Luc que contiene solo el elemento de respuesta a interferón (IRF-E) no fue modificada ni tras el tratamiento con el IFN γ , ni con el tratamiento conjunto con el 9cRA y el IFN γ , a las dosis utilizadas en este estudio.

Con objeto de saber qué elementos de respuesta son críticos para el sinergismo observado con el tratamiento 9cRA/IFN γ , mutamos sistemáticamente cada elemento de respuesta presente en el fragmento que contiene -247 pb (Figura 9C). La mutagénesis dirigida de los elementos de respuesta presentes mostró la importancia de dos elementos de respuesta a NF- κ B en las posiciones -210 y -147 (mutantes m3 y m5, respectivamente) y pone en relevancia la contribución de los elementos de respuesta AP-1 en la posición -233 y -220 (mutante m1 y m2, respectivamente) y el sitio IRF-E en la posición -130 (mutante m6) a la activación global del promotor de cIAP2 por el 9cRA en combinación con el IFN γ (Figura 9D). Como ya había descrito nuestro grupo, curiosamente, la combinación 9cRA/IFN γ activa la transcripción del promotor del gen cIAP2 a través de los mismos elementos de respuesta utilizados por el 9cRA, aunque la magnitud de la activación es menor en este último caso. La inducción de la activación transcripcional por el IFN γ de esta serie de construcciones es también semejante a la observada con el 9cRA aunque la magnitud de la respuesta es mucho menor a la obtenida con el 9cRA. Estos datos claramente demuestran que NF- κ B está críticamente implicado en la activación transcripcional del promotor cIAP2 por el 9cRA en combinación con el IFN γ y que potencialmente otros factores, como cJUN e IRFs contribuyen a la respuesta global.

1.3. La depleción de cIAP2 no sensibiliza las células SK-BR-3 a la acción pro-apoptogénica del 9cRA en combinación con el IFN γ

Como he comentado anteriormente, está ampliamente admitido que el AR en combinación con el IFN ejerce una potente actividad antiproliferativa y pro-apoptótica en diferentes sistemas celulares tumorales y en particular, en las células de cáncer de mama (Lindner *et al.*, 1997; Widschwendter *et al.*, 1996; Widschwendter *et al.*, 1997b). En células SK-BR-3, hemos comprobado que el AR y el IFN γ en combinación poseen potentes efectos inhibidores sobre la proliferación (Figura 6), sin embargo, son débiles inductores de la apoptosis en este sistema celular (Figura 10B). Así, resumiendo, nuestros resultados junto a datos de la literatura indican que el 9cRA en combinación con el IFN γ es capaz de inducir programas genéticos opuestos, por un lado es capaz de inducir un gen como TRAIL, un gen pro- apoptótico (Clarke *et al.*, 2004b), y por otro lado, son capaces de inducir un gen como cIAP2, al que la literatura otorga un reconocido papel anti-apoptótico. Estos resultados nos llevaron a pensar que el 9cRA en combinación con el IFN γ no desarrolla su total potencial pro-apoptótico debido a la inducción de estos programas anti-apoptóticos. Para testar esta hipótesis, la expresión de cIAP2 fue suprimida mediante la transfección transitoria de un siRNA dirigido contra cIAP2. Aunque la transfección del siRNA-cIAP2 suprimió eficientemente los niveles de proteína cIAP2 inducidos tras el tratamiento conjunto con el 9cRA y el IFN γ , si lo comparamos con las condiciones en las que transfectamos un si-control (Figura 10A), dicha inhibición no fue suficiente

para sensibilizar las células a la acción pro-apoptótica del 9cRA y el IFN γ , y tampoco afectó al tratamiento único por 9cRA o IFN γ (Figura 10B). En la figura 10A, y como control de la actividad de los agentes empleados, se muestra que en las células transfectadas con un *siRNA*-cIAP2, la inducción de TRAIL por 9cRA/IFN γ es similar a la obtenida en las condiciones control. Como se muestra en la figura 10B, si comparamos los resultados obtenidos en las células sin transfectar (que no reciben agente de transfección ni *siRNA*), en las células tratadas con DharmaFECT (que no reciben *siRNA*) y en las células transfectadas con los distintos *siRNAs*, observamos que las condiciones de transfección utilizadas en el desarrollo de estos experimentos no modifican en gran medida la muerte basal de las células analizadas. Estos resultados sugieren que la depleción de cIAP2 en células de cáncer de mama tratadas con la combinación 9cRA/IFN γ no es suficiente para sensibilizar las células SK-BR-3 a la acción pro-apoptogénica del 9cRA/IFN γ , quizá porque no ejerza tal papel en este sistema celular o quizá porque otros miembros de la familia puedan suplir su ausencia.

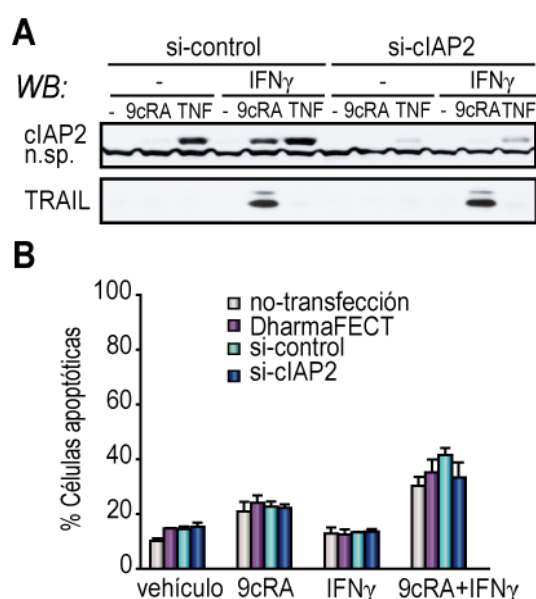


Figura 10. La depleción de cIAP2 no sensibiliza las células SK-BR-3 a los efectos pro-apoptogénicos del 9cRA y el IFN γ en la línea celular SK-BR-3. **(A)** Análisis mediante *Western Blot* con anticuerpos anti-cIAP2 y anti-TRAIL de extractos totales de células SK-BR-3 transfectadas 24 h con un *siRNA*-control o un *siRNA*-cIAP2, seguido de 24 h de recuperación previas al tratamiento con el vehículo, 9cRA, IFN γ , o 9cRA e IFN γ durante 72 h. Se utilizó como control de carga la señal no específica (n.sp.). El TNF α (10 ng/ml) se empleó como control positivo de la inducción de c-IAP2. La imagen muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes. **(B)** El porcentaje de células apoptóticas se determinó por citometría de flujo mediante marcaje con yoduro de propidio de células no transfectadas o transfectadas con un *siRNA*-control inespecífico (si-control) o un *siRNA* específico contra c-IAP2 (si-clAP2) o sin *siRNA* en presencia del agente DharmaFECT, después del tratamiento con el vehículo, 9cRA, IFN γ , o 9cRA e IFN γ durante 48 h. Los datos representan la media \pm SD de un experimento representativo de tres independientes realizados por duplicado.

2. El AR y el receptor tipo-Toll 3 (TLR3): análisis de su interacción funcional en células de cáncer de mama

2.1. El 9cRA solo o en combinación con el IFN γ aumenta los niveles de ARNm y de proteína de TLR3

Tal y como indicamos en el comienzo de los resultados de este estudio, otro de los genes que encontramos en el análisis del perfil de expresión génica inducido por el 9cRA en combinación con el IFN γ en la línea celular de cáncer de mama SK-BR-3, fue TLR3. Los niveles de ARNm de TLR3 aumentaron en el mencionado *array* 191.75 veces con respecto a las condiciones control, tras 24 h de tratamiento (datos no mostrados). TLR3 reconoce ARN de doble cadena (*dsRNA*) y está implicado en la respuesta inmunitaria innata frente a la infección por virus. Además, TLR3 está considerado como una nueva diana molecular en el tratamiento del cáncer porque la activación de TLR3 por el ligando sintético, el ácido poliinosínico-policitidílico [poly(I:C)], causa directamente la muerte de células tumorales, además de potenciar la respuesta inmunitaria frente al tumor mediante la producción de citoquinas y quimioquinas por parte del sistema inmunitario.

Para confirmar la inducción de la expresión de TLR3 en la línea celular SK-BR-3 por la combinación 9cRA/IFN γ , analizamos los niveles de ARNm y proteína mediante RT-qPCR y *western blot*, respectivamente (Figura 11). El análisis de los niveles de ARNm tras el tratamiento por el 9cRA y/o el IFN γ a diferentes tiempos muestra que el 9cRA induce la

expresión de TLR3 de manera progresiva hasta alcanzar alrededor de 30 y 50 veces a las 24 y 48 h, algo que se asemeja a la inducción de la expresión de TLR3 encontrada tras el tratamiento con IFN γ aunque de magnitud ligeramente mayor, sin embargo en el caso del tratamiento conjunto, la inducción aumenta gradualmente en el tiempo, alcanzando cerca de 400 y 600 veces, a las 24 y 48 h, respectivamente (Figura 11A). El análisis por *western blot* de extractos totales de células SK-BR-3 tratadas como se indica en la figura 11B muestran como los niveles de proteína de TLR3 inducidos por el 9cRA no son detectables en estas condiciones de experimentación, sin embargo, el tratamiento con el IFN γ induce ligeramente la expresión de TLR3 a las 12 h manteniéndose en el tiempo (Figura 11B). Curiosamente, el tratamiento con los dos agentes induce sinérgicamente los niveles de TLR3 a las 12 h y se incrementan de manera progresiva en el tiempo. Estos datos confirman los resultados obtenidos anteriormente en los *arrays* de expresión.

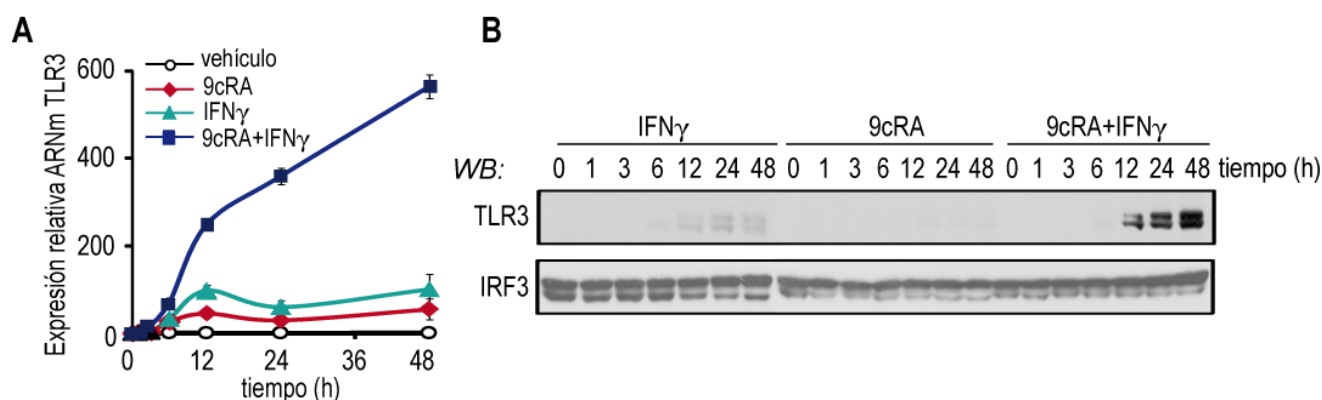


Figura 11. El 9cRA y el IFN γ inducen de manera sinérgica la expresión de TLR3 en la línea celular de cáncer de mama SK-BR-3. **(A)** Análisis de los niveles de ARNm de TLR3 en las células SK-BR-3 tratadas con 9cRA y/o IFN γ a diferentes tiempos mediante RT-qPCR. La expresión de TLR3 fue normalizada con respecto a la expresión de la β -actina. Los datos representan la media \pm SD de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por duplicado. **(B)** Análisis por *Western Blot* de los niveles de proteína TLR3, utilizando los niveles de la proteína IRF3 como control de carga, en extractos de células SK-BR-3 tratadas con 9cRA, IFN γ o el tratamiento conjunto 9cRA e IFN γ , en los tiempos indicados. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Además, para conocer si la regulación de la expresión de TLR3 por el 9cRA y el IFN γ tenía lugar en otros sistemas celulares, analizamos otras cinco líneas celulares de cáncer de mama, denominadas T47-D, Hs578-T, BT-474, H3396 y ZR-75-1, tras el tratamiento con el 9cRA y/o el IFN γ , mediante RT-qPCR y *western blot*, respectivamente (Figura 12).

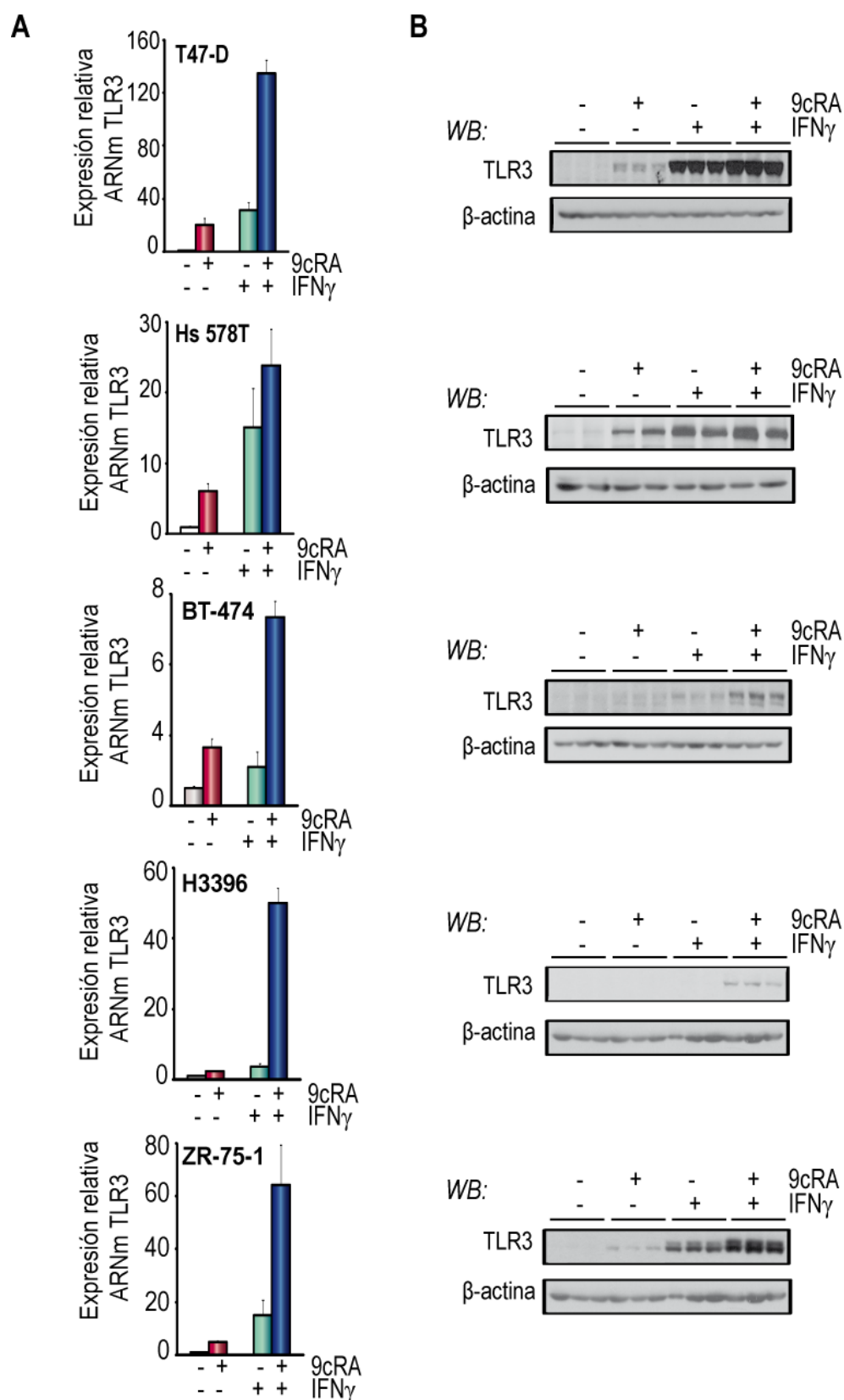


Figura 12. El 9cRA y el IFN γ inducen de manera sinérgica la expresión del receptor tipo toll-3 (TLR3) en diferentes líneas celulares de cáncer de mama. (A) Análisis mediante RT-qPCR de la expresión de TLR3 después del tratamiento con el 9cRA y/o el IFN γ en las líneas celulares de cáncer de mama T47-D, Hs 578T, BT-474, H3396 y ZR-75-1. Los datos representan la media \pm SD de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por duplicado. (B) Análisis por *Western Blot* con anticuerpos anti-TLR3 y anti- β -actina de extractos totales de las células indicadas y que han sido tratadas como en (A). Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes.

En la mayoría de las líneas celulares analizadas, los niveles de ARNm de TLR3 aumentaron tras el tratamiento con el 9cRA, la inducción de la expresión de TLR3 encontrada tras el tratamiento con IFN γ fue semejante a la inducción que habíamos encontrado tras el tratamiento con 9cRA, sin embargo en el caso del tratamiento conjunto, la inducción aumenta de manera sinérgica (Figura 12A). El análisis por *western blot* de extractos celulares totales de las distintas líneas mencionadas tratadas como se indica en la figura 12B muestran como el 9cRA induce los niveles de proteína de TLR3 (en tres de las cinco líneas analizadas), el IFN γ induce los niveles de proteína notablemente (en tres de las cinco líneas analizadas), y el tratamiento con los dos agentes induce de manera aditiva/sinérgica los niveles de proteína de TLR3 en todas las líneas analizadas (Figura 12B). En conjunto, estos resultados junto a los resultados obtenidos en las células SK-BR-3 (Figura 11) confirman los datos obtenidos en el análisis del perfil de expresión génica, y sugieren que el 9cRA y el IFN γ inducen de manera sinérgica la expresión de TLR3 en diversas líneas celulares de cáncer de mama.

Del conjunto de estos resultados, nos llamó especialmente la atención que el 9cRA, por sí solo, es capaz de inducir la expresión de TLR3, en la mayor parte de las líneas celulares estudiadas, concretamente en las líneas tumorales de mama SK-BR-3, T47-D, Hs578-T, BT-474 y ZR-75-1. Ya que disponemos en el laboratorio de un panel más amplio de líneas tumorales de carcinoma de mama, cuantificamos mediante PCR cuantitativa, los niveles de expresión del receptor TLR3 en seis líneas más. Nuestros resultados indican que el 9cRA induce la expresión de TLR3 en seis de las diez líneas celulares estudiadas. Sin embargo, el 9cRA induce significativamente la expresión de TLR3 en el resto de líneas celulares de cáncer de mama analizadas, llegando a alcanzar alrededor de 20 veces de inducción en el caso de la línea T47D y alrededor de 60 veces en la línea SK-BR-3 (Figura 13). Así, nuestros resultados sugieren que TLR3, una recientemente designada diana terapéutica en el tratamiento contra el cáncer, es un gen diana de la acción del ácido retinoico.

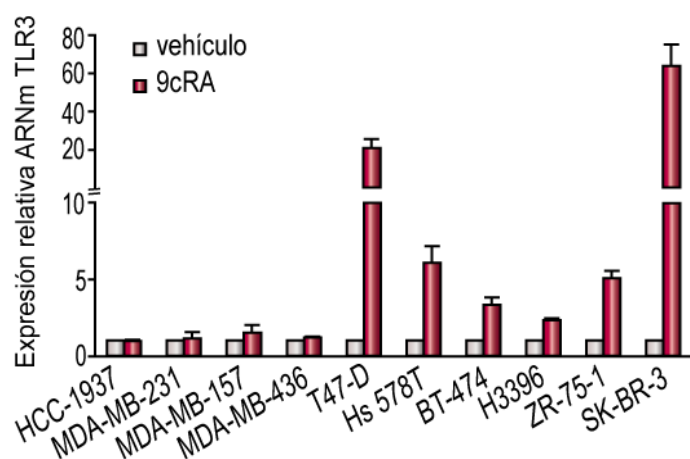


Figura 13. El tratamiento con el 9cRA regula la expresión de TLR3 en diferentes líneas celulares de carcinoma de mama. Análisis de los niveles de ARNm de TLR3 en las líneas celulares de carcinoma de mama HCC-1937, MDA-MB-231, MDA-MB-157, MDA-MB-436, T47-D, Hs578-T, BT-474, H3396, ZR-75-1 y SK-BR-3 tratadas con el vehículo o el 9cRA durante 48 horas. La expresión de TLR3 fue normalizada con respecto a la expresión de la β -actina. Los valores representan la media \pm SD de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

2.2. El 9cRA regula la expresión de TLR3 de manera indirecta en las células SK-BR-3

Seguidamente, estudiamos el mecanismo por el cual los retinoides inducen la expresión de TLR3 (Figura 14). Por esta razón, usamos el inhibidor de la síntesis de proteína, cicloheximida en combinación con el 9cRA o vehículo, tal y como indica la figura 14A. Mediante RT-qPCR, comparamos los niveles de expresión de TLR3 (Figura 14A) y los niveles de expresión del gen RAR β (Figura 14B), que posee elementos de respuesta consenso (RAREs) a través de los cuales el ácido retinoico unido a su receptor regula directamente su expresión. Observamos, que mientras la inducción de la expresión de RAR β por 9cRA no era suprimida en presencia de cicloheximida denotando un efecto transcripcional directo del 9cRA, el aumento en la expresión de TLR3 por 9cRA quedaba completamente suprimido en presencia de

cicloheximida, indicando que la regulación de la expresión de TLR3 por 9cRA es indirecta y depende de la síntesis de *ново* del factor o de los factores de transcripción que median su acción.

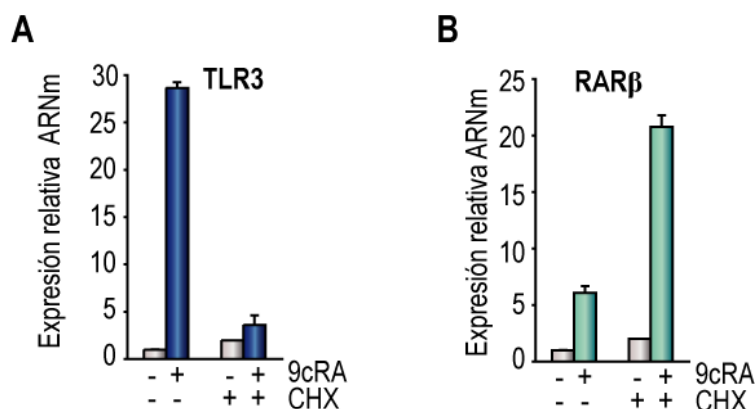


Figura 14. El 9cRA regula de manera indirecta la transcripción de TLR3. **(A)** Análisis mediante RT-qPCR de los niveles de ARNm de TLR3 en células SK-BR-3 tratadas con vehículo (barras grises) o 9cRA (barras azules) durante 24 h que habían sido pretratadas durante 2 h con cicloheximida (2.5 µg/ml) como se indica. Se representa la media ± SD de tres experimentos independientes realizados por duplicado. **(B)** Análisis mediante RT-qPCR de los niveles de ARNm de RARβ en células SK-BR-3 tratadas con vehículo (barras grises) o 9cRA (barras verdes) durante 24 h que habían sido pretratadas durante 2 h con cicloheximida (2.5 µg/ml) como se indica. Se representa la media ± SD de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

2.3. El 9cRA y el poly(I:C), un ligando del receptor TLR3, cooperan para inhibir el crecimiento de células de cáncer de mama

Tras la identificación del receptor TLR3 como un gen cuya expresión está regulada por el AR en las líneas celulares de cáncer de mama analizadas, decidimos explorar la potencial interacción funcional entre el AR y los agonistas de TLR3 en distintas líneas celulares de cáncer de mama. Dado que el AR aumenta los niveles de ARNm y de proteína de TLR3 en la mayoría de las líneas celulares analizadas, supusimos que, probablemente, la sensibilidad de los sistemas celulares estudiados ante los efectos de agonistas del receptor TLR3, como el poly(I:C), podría estar modulada por el AR.

Actualmente, se sabe que el receptor TLR3 reconoce *dsRNA* de origen viral o derivados sintéticos, como el poly(I:C) o el poly(A:U). Ambos, han sido usados como adyuvantes en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama. A pesar de que inicialmente la acción de estos agonistas sintéticos ha sido inducir una respuesta inmune contra el propio tumor, recientes estudios sugieren que los agonistas de TLR3 podrían tener efectos proapoptóticos directos en las células tumorales, desencadenando la muerte de las mismas. Así, tal y como señalamos en la introducción se ha descrito que el poly(I:C) induce la apoptosis en cultivos *in vitro* de células de cáncer de mama (Salaun *et al.*, 2006). En base a estos datos, los experimentos que se presentan a continuación estudian los efectos que tienen el 9cRA y el poly(I:C), solos o en combinación, sobre la proliferación y la apoptosis de células de cáncer de mama.

Está bien establecido en la literatura, que el AR inhibe la proliferación de células de cáncer de mama *in vitro* y que esta inhibición está acompañada por un bloqueo en la fase G1 del ciclo celular. Dado que como hemos visto, el tratamiento con el 9cRA eleva los niveles del receptor TLR3, decidimos estudiar por un lado los efectos que tenía el tratamiento con un agonista para TLR3 sobre la proliferación de distintas líneas de cáncer de mama y por otro lado, si el tratamiento por AR modulaba estos efectos (Figura 15). Por esta razón, cuantificamos la proliferación de diferentes líneas celulares de cáncer de mama en respuesta a 9cRA en presencia de vehículo o de diferentes dosis de poly(I:C) (Figura 15A). Como se muestra en la figura 15A, en todas ellas a excepción de la línea SK-BR-3 observamos que el poly(I:C) por

sí solo posee efectos antiproliferativos en estos sistemas. Por su parte, el 9cRA, en mayor o menor medida inhibe la proliferación de las líneas celulares analizadas, con excepción de las células H3396, en la que no encontramos diferencias significativas, al menos en las condiciones ensayadas. El tratamiento conjunto con el 9cRA y el poly(I:C) resultó en una mayor inhibición de la proliferación celular de las diferentes líneas celulares estudiadas SK-BR-3, ZR-75-1, T47-D y H3396, como se observa en las curvas de dosis-respuesta al poly(I:C) representadas gráficamente en la figura 15A. Resulta llamativa, la inhibición sinérgica que observamos en las células SK-BR-3 en presencia de 9cRA y 50 $\mu\text{g/ml}$ de poly(I:C) registrada a las 48 h del tratamiento. Concretamente, el porcentaje de inhibición de crecimiento es de un 80% con respecto al cultivo control. En esta línea celular, analizamos la inhibición de la proliferación celular tras el tratamiento con 9cRA y/o poly(I:C) a diferentes tiempos (Figura 15B). El tratamiento conjunto con el 9cRA y con el poly(I:C), tal y como muestra la figura 15B, inhibió el crecimiento celular de manera dependiente del tiempo, que fue del 60% y más del 80% a las 48h y 72h respectivamente. Estos resultados sugieren que estas dos vías de señalización son capaces de cooperar para inhibir el crecimiento de las células de cáncer de mama.

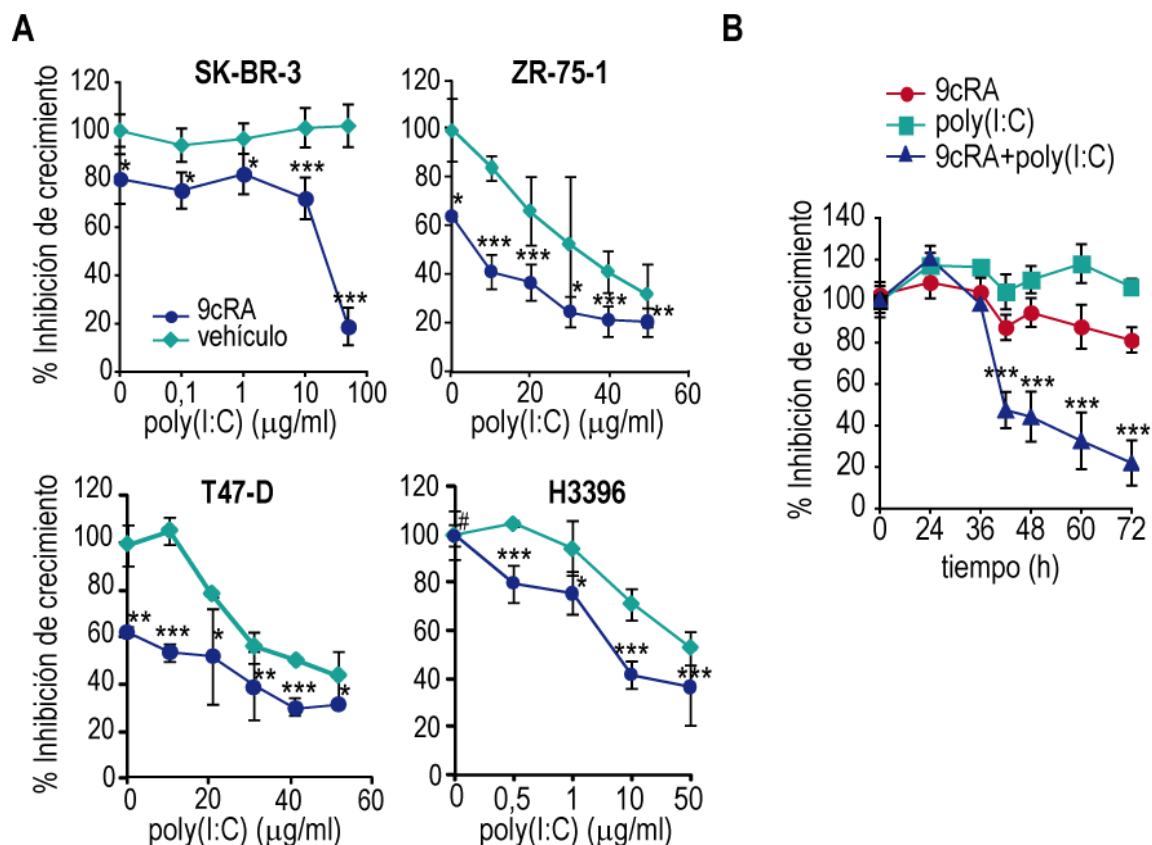


Figura 15. El 9cRA y el poly(I:C) inhiben la proliferación celular en diferentes líneas celulares de cáncer de mama. (A) Las células SK-BR-3, ZR-75-1, T47-D y H3396 fueron tratadas con diferentes dosis de poly(I:C) en ausencia (vehículo) o presencia de 9cRA 1 μM durante 48 h. El porcentaje de inhibición del crecimiento se cuantificó mediante la tinción con el colorante cristal violeta. Se representa la media \pm SD de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas y la almohadilla indica diferencias no significativas entre células no tratadas y tratadas con 9cRA. **(B)** Análisis del efecto de la inhibición de la proliferación en las células SK-BR-3 por el tratamiento con el 9cRA y/o el poly(I:C) en los tiempos indicados. La cuantificación de la inhibición del crecimiento se determinó mediante la tinción con el colorante cristal violeta. Se representa la media \pm SD de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre células tratadas con 9cRA y células tratadas con 9cRA y poly(I:C).

2.4. El 9cRA y el poly(I:C) inducen la muerte de las células de cáncer de mama

Está ampliamente documentado en la literatura que la inhibición de la proliferación ejercida por el AR en las células de cáncer de mama, está asociada a un bloqueo en la fase G1 del ciclo celular y en determinados contextos celulares, el AR es capaz de inducir la muerte celular (Jimenez-Lara *et al.*, 2010). Por otro lado, recientemente, se ha descrito que el poly(I:C) es capaz de inducir la apoptosis de células de cáncer de mama (Salaun *et al.*, 2006).

Las células SK-BR-3 se caracterizan por presentar una morfología epitelial heterogénea y dependiendo de su capacidad de adhesión al sustrato algunas células aparecen redondeadas y otras poligonales (aquellas que están más adheridas al sustrato), además son mono o multinucleadas. En nuestro estudio, como se representa en la figura 16A, observamos mediante microscopía de contraste de fases que las células SK-BR-3 que habían sido tratadas con el 9cRA en combinación con el poly(I:C) sufrían alteraciones en la membrana citoplásmica (falta de adhesión al sustrato) y en el núcleo de las células (condensación de la cromatina) si las comparamos con las células tratadas con el vehículo solamente (células control) (Figura 16A). Estas alteraciones morfológicas son características de las células apoptóticas. El tratamiento de las células SK-BR-3 sólo con el 9cRA indujo alteraciones morfológicas que se caracterizan por la emisión de prolongaciones citoplasmáticas. La morfología de las células SK-BR-3 tratadas con el poly(I:C) no cambió sustancialmente con respecto al tratamiento control. En ambos casos, no se observó alteraciones morfológicas que denotaran muerte celular. Estas observaciones sugerían la potencial contribución de la muerte celular a los efectos antiproliferativos inducidos tras el tratamiento conjunto con el 9cRA y el poly(I:C) en las células SK-BR-3. Para confirmarlo, analizamos mediante tinción con yoduro de propidio (IP) y citometría de flujo la población de células cuyo contenido en ADN es menor a 2n como medida de muerte celular. Como se muestra en la figura 16B, ni el tratamiento con el 9cRA a la concentración farmacológica 10^{-6} M ni con el poly(I:C) afectaron significativamente a la viabilidad de las células SK-BR-3, sin embargo, el tratamiento conjunto con el 9cRA y el poly(I:C) indujo la muerte celular (Figura 16B). Resultados similares fueron encontrados en las células ZR-75-1 con la única diferencia que la muerte inducida por el poly(I:C) fue mayor que en el caso de las células SK-BR-3. En la línea de cáncer de mama, Hs578-T, el 9cRA en combinación con el poly(I:C) sólo fueron capaces de inducir apoptosis cuando la síntesis de proteínas fue inhibida, la adición de cicloheximida (CHX) al medio de cultivo fue suficiente para sensibilizar las células Hs 578T, pero no las células H3396 y T47D, a los efectos pro-apoptogénicos del 9cRA y el poly(I:C), sugiriendo que un inhibidor de la muerte celular inducida por el 9cRA en combinación con el poly(I:C) se expresa en particular en esta línea celular y que ha de degradarse primero antes de la inducción de la muerte celular. Como la presencia de CHX puede llevar a la confusión en el análisis de las vías de transducción implicadas, decidimos dirigir nuestros esfuerzos al análisis de la vías de transducción que median la muerte inducida por el 9cRA y el poly(I:C) en las células SK-BR-3 y las células ZR-75-1. El 9cRA coopera con el poly(I:C) para inducir la muerte de las células SK-BR-3 de manera dosis-dependiente (Figura 16C). La cooperación entre el 9cRA y el poly(I:C) para inducir la muerte celular es específica de poly(I:C) ya que otro *dsRNA*, el ácido poly(A:U) no coopera con el 9cRA para inducir la muerte de las células SK-BR-3 (Figura 16D). La muerte celular inducida por el tratamiento conjunto con el 9cRA y el poly(I:C) es un proceso dependiente de la activación de las caspasas, la figura 16E muestra como el cotratamiento conjunto con el 9cRA y el poly(I:C) en las células SK-BR-3, activa la caspasa-3 y la caspasa-8 (Figura 16E).

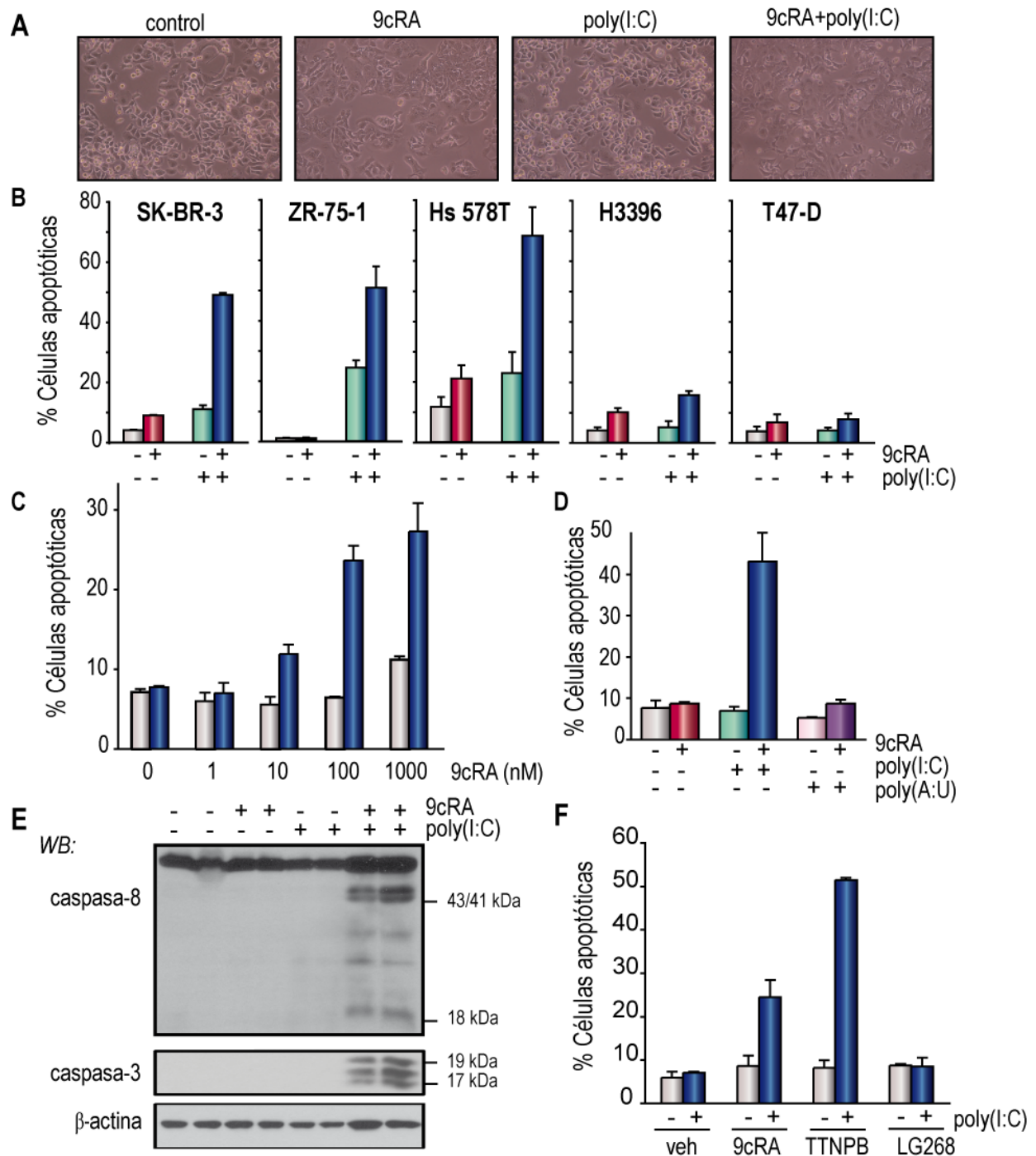


Figura 16. El 9cRA y el poly(I:C) inducen la apoptosis de las células de cáncer de mama. **(A)** El tratamiento combinado con el 9cRA y el poly(I:C) en las células SK-BR-3 inducen cambios morfológicos que se asocian con la muerte celular. Imágenes de microscopía de contraste de fase de células SK-BR-3 tratadas 48 h con el 9cRA y/o el poly(I:C). **(B)** Las líneas de cáncer de mama que se indican en la figura fueron tratadas con vehículo, 9cRA, poly(I:C), y 9cRA/poly(I:C) por 48h, y se determinó la muerte celular mediante tinción con ioduro de propidio y el análisis posterior por citometría de flujo. En el caso de las células Hs 578T, H3396 y T47-D, las células fueron pretratadas con 9cRA durante 24h, se añadió cicloheximida (CHX) a una concentración de 2,5 μ g/ml dos horas y media antes de estimular las células con poly(I:C) o vehículo por 24 h más. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado. **(C)** Las células SK-BR-3 fueron tratadas con el vehículo (barras grises) o el poly(I:C) (barras azules) en presencia de concentraciones crecientes de 9cRA. La muerte celular se determinó como en (B). Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado. **(D)** Las células SK-BR-3 fueron tratadas con vehículo, 9cRA, poly(I:C) o 9cRA/poly(I:C) o alternativamente, tal y como aparece indicado, poly(A:U). El porcentaje de células positivas para la tinción con ioduro de propidio fue cuantificado como en (B). Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos realizados por triplicado. **(E)** El inmunoblot muestra el procesamiento de la procaspasa 8 y la inducción de la caspasa-3 activa después del tratamiento con 9cRA, poly(I:C) o 9cRA/poly(I:C). Los productos que resultan del procesamiento de la pro-caspasa-8 están indicados como p43/41 y p18. Los niveles de β -actina fueron usados como control de carga. Este inmunoblot es un experimento representativo de tres experimentos independientes. **(F)** Las células SK-BR-3 fueron tratadas 48 h con vehículo (veh), 9cRA, y los agonistas específicos de RAR (TTNPB) y RXR (LG268) en ausencia o presencia de poly(I:C). El porcentaje de muerte celular se determinó como en (B). Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos realizados por triplicado.

Ya que el 9cRA es un agonista tanto para RAR como para RXR, usamos agonistas específicos para evaluar la contribución de cada uno de estos receptores a la muerte celular inducida por la combinación 9cRA/poly(I:C) (Figura 16F). Como se muestra en la figura 16F, mientras TTNPB, un agonista específico de RAR coopera claramente con el poly(I:C) para inducir la apoptosis de las células SK-BR-3, el agonista específico de RXR, LG268, no afecta la viabilidad de estas células solo o en combinación con el poly(I:C). Estos resultados sugieren que la muerte celular dependiente de caspasas contribuye a los efectos antiproliferativos inducidos por la combinación 9cRA/poly(I:C) en las células de cáncer de mama.

2.5. El 9cRA y el poly(I:C) cooperan para inducir la expresión de los “sensores” celulares de *dsRNA*: el receptor tipo-Toll 3, TLR3, las helicasas citosólicas RIG-1 y MDA-5 y la quinasa PKR en las líneas celulares de cáncer de mama SK-BR-3 y ZR-75-1

Además de TLR3, las vías de transducción mejor conocidas que actúan como “sensores” de la presencia de *dsRNA* en la célula son MDA-5, RIG-1 y PKR, la proteína quinasa activada por *dsRNA*, también denominada EIF2AK2 (Takeda and Akira, 2004; Takeuchi and Akira, 2010). Como hemos demostrado antes, la expresión de TLR3 está regulada por el 9cRA en las células de cáncer de mama, lo siguiente que quisimos investigar fue si el 9cRA y el poly(I:C), solos o en combinación regulan los niveles de ARNm y de proteína de estos “sensores” de *dsRNA* en células de cáncer de mama.

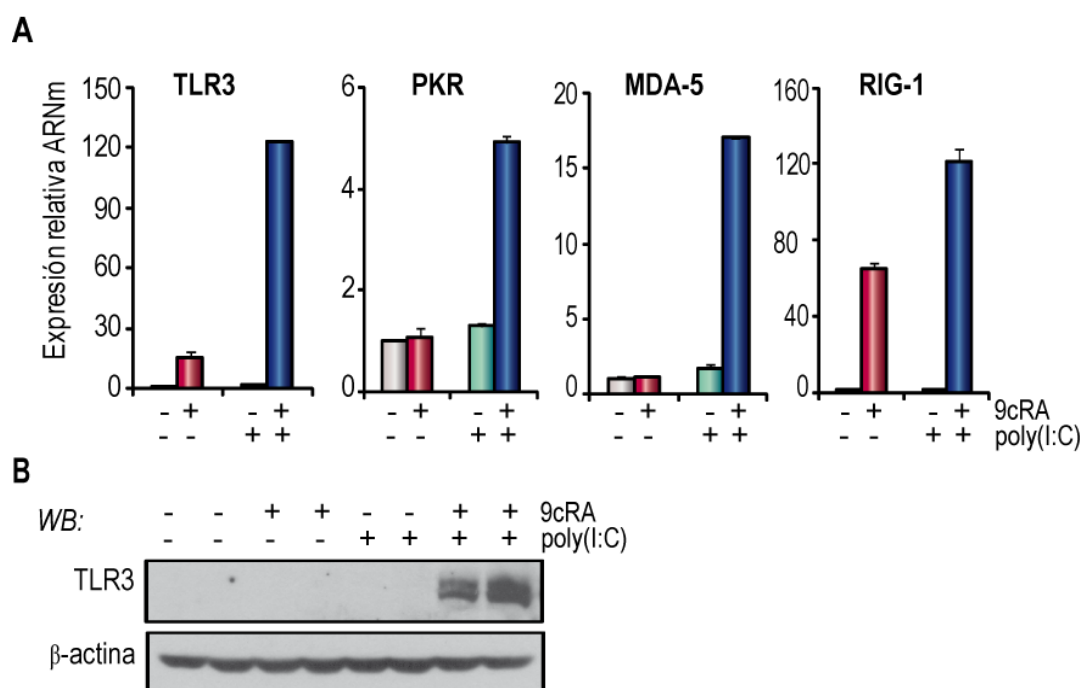


Figura 17. El 9cRA y el poly(I:C) cooperan para inducir la expresión de diversos “sensores” moleculares para *dsRNA* en células SK-BR-3: el receptor TLR3, la quinasa PKR, y las helicasas MDA-5 y RIG-1 **(A)** Análisis mediante RT-qPCR de los niveles de ARNm de los siguientes genes: TLR3, MDA-5, RIG-1 y PKR, en las células SK-BR-3 tratadas con el vehículo, 9cRA y/o poly(I:C) durante 24 horas. La expresión para cada gen fue normalizada con los niveles de ARNm del gen β -actina. Los valores representan la media \pm SD de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por duplicado. **(B)** Análisis de los niveles de la proteína TLR3 mediante *Western blot*, utilizando como control de carga β -actina, en células SK-BR-3 tratadas durante 48 h con vehículo, 9cRA y/o poly(I:C). Se representa un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Como se muestra en la figura 17A, la expresión de TLR3 y RIG-1 está fuertemente inducida por 9cRA, sin embargo, no observamos regulación de la expresión de MDA-5 y PKR por el 9cRA en las células de cáncer de mama SK-BR-3 (Figura

17A). En esta línea celular, observamos que el tratamiento con poly(I:C) no induce la expresión de estos genes. Resulta particularmente interesante que la combinación 9cRA/poly(I:C) induce de manera sinérgica la expresión de todos los "sensores" analizados, muy por encima de la inducción observada por cada uno de estos agentes por separado. Mediante experimentos de *western blot* demostramos que el tratamiento conjunto 9cRA y poly(I:C) induce de manera sinérgica los niveles de proteína de TLR3 en la línea celular de cáncer de mama SK-BR-3 (Figura 17B).

Los resultados encontrados en las células ZR-75-1 demuestran la cooperación entre el 9cRA y el poly(I:C) en la regulación de los "sensores" de *dsRNA* con la excepción de PKR, además comprobamos que en esta línea celular la inducción de la expresión de estos genes por poly(I:C) es mayor que en la células SK-BR-3 (Figura 18). Estos resultados sugieren que el 9cRA y el poly(I:C) cooperan para amplificar la respuesta celular al *dsRNA*.

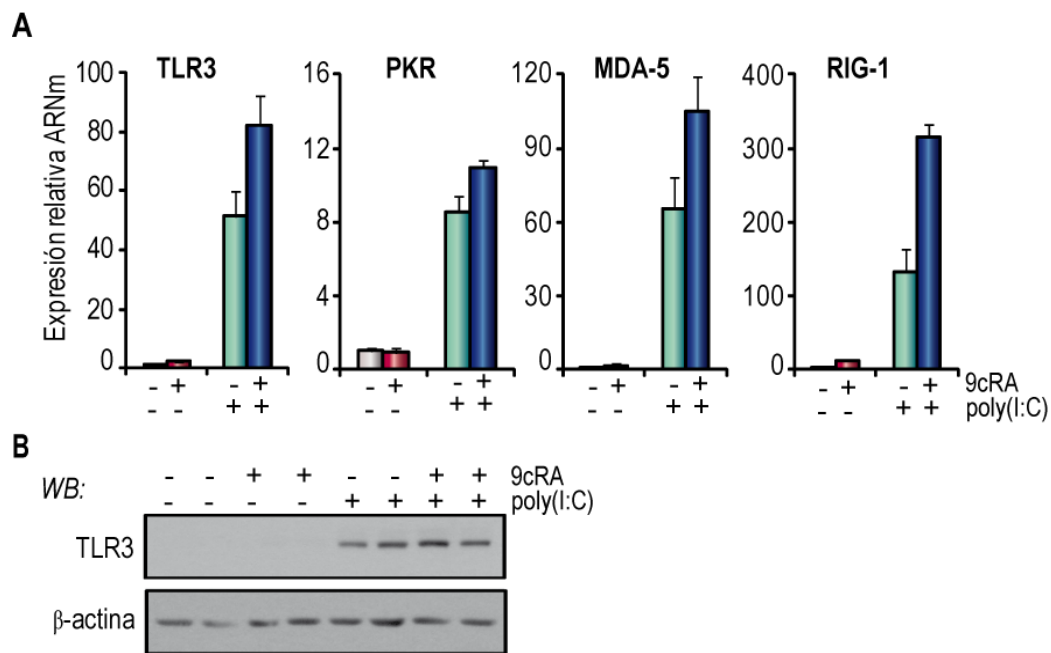


Figura 18. El 9cRA y el poly(I:C) cooperan para inducir la expresión de diversos "sensores" moleculares para *dsRNA* en células ZR-75-1: el receptor TLR3, la quinasa PKR, y las helicasas MDA-5 y RIG-1. (A) Análisis mediante RT-qPCR de los niveles de ARNm de los siguientes genes: TLR3, MDA-5, RIG-1 y PKR, en células ZR-75-1 tratadas con el vehículo, 9cRA y/o poly(I:C) durante 24 horas. La expresión para cada gen fue normalizada con los niveles de ARNm del gen β -actina. Los valores representan la media \pm SD de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por duplicado. (B) Análisis de los niveles de la proteína TLR3 mediante *Western blot*, utilizando como control de carga β -actina, en células ZR-75-1 tratadas durante 48 h con vehículo, 9cRA y/o poly(I:C). Se representa un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

2.6. La apoptosis inducida por el 9cRA y el poly(I:C) se asocia con la activación de IRF3 y de NF- κ B en la línea celular SK-BR-3

La principal función de los "sensores" de *dsRNA* es promover una contundente respuesta ante una infección viral mediante la producción de interferón de tipo I (Kawai and Akira, 2006; Meylan *et al.*, 2006; Salaun *et al.*, 2007b). Los "sensores" de *dsRNA* responden a la infección del virus activando factores de transcripción como el IRF3 (*Interferon Regulatory Factor-3*) y el NF- κ B (*Nuclear Factor-kappa B*), los cuales organizan un programa transcripcional temprano que es independiente del interferón. Los transcritos sintetizados durante esta fase temprana, incluyendo los que codifican por el IFN β y otras proteínas antivirales caracterizan el denominado estado antiviral temprano. Los interferones, sintetizados y secretados por

las células infectadas, a su vez, amplifican la respuesta antiviral mediante la transcripción de una gama más amplia de genes antivirales en forma tanto autocrina como paracrina, llevando al establecimiento del estado antiviral.

En nuestro estudio, y en consonancia con lo que acabamos de comentar, observamos que el tratamiento simultáneo con el 9cRA y el poly(I:C) de las células SK-BR-3, además de inducir los “sensores” para *dsRNA*, inducía de manera sinérgica la fosforilación de IRF3 tras 12h de tratamiento simultáneo con el 9cRA y el poly(I:C). No se observó inducción de la fosforilación de IRF3 cuando las células fueron tratadas con sólo el 9cRA o el poly(I:C) en las células SK-BR-3 (Figura 19A). Sin embargo, utilizando las mismas condiciones de experimentación no observamos cambios significativos en la degradación de I κ B α (considerada como una medida indirecta de la activación de NF- κ B) después del tratamiento simultáneo con el 9cRA y el poly(I:C) (datos no mostrados). Por el contrario, si tratamos con el poly(I:C) células control o células que han sido pretratadas durante 48h con 9cRA, observamos que el poly(I:C) es capaz de inducir la degradación de I κ B α después de 60 minutos. Esta degradación de I κ B α inducida por el poly(I:C) se potenció y se mantuvo en el tiempo (60 y 180 minutos) cuando las células habían sido pretratadas con el 9cRA durante 48 h. La activación de fosfo-IRF3 por el tratamiento secuencial del 9cRA y el poly(I:C) se produjo tras tres horas en estas condiciones experimentales (Figura 19B).

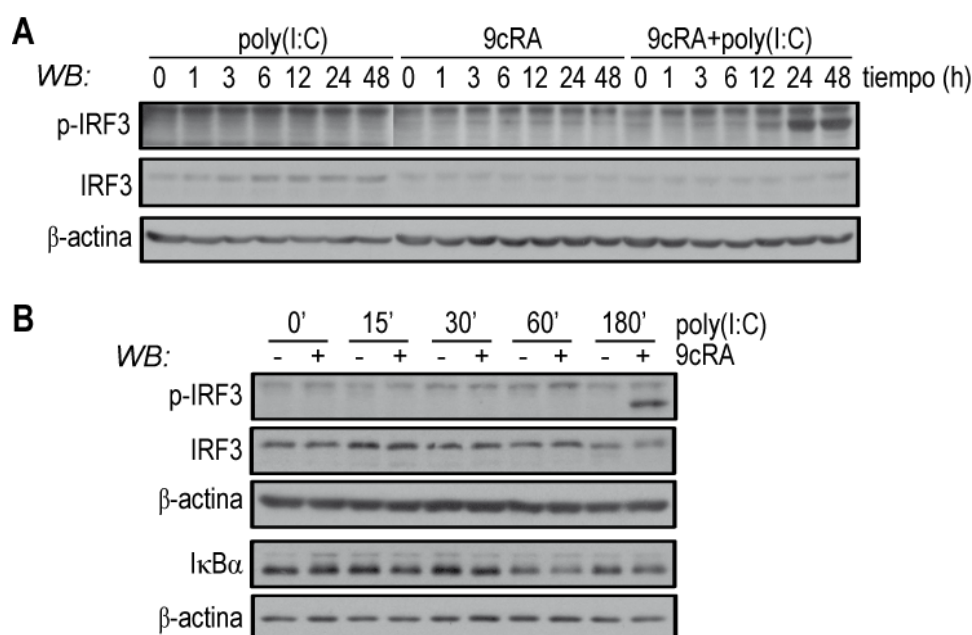


Figura 19. El tratamiento combinado con el 9cRA y el poly(I:C) induce la fosforilación de IRF3 y la degradación de I κ B α , en células SK-BR-3. (A) Análisis por *Western Blot* de los niveles de proteínas p-IRF3 e IRF3, utilizando la β -actina como control de carga, en extractos de células SK-BR-3 tratadas con el 9cRA, el poly(I:C) o el tratamiento conjunto con el 9cRA y el poly(I:C), en los tiempos indicados. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados. **(B)** Células SK-BR-3 pre-tratadas con vehículo o 9cRA durante 24 horas, fueron posteriormente estimuladas con 50 μ g/ml poly(I:C) en los tiempos indicados. Análisis mediante *Western Blot* de los niveles de las proteínas IRF3, p-IRF3 e I κ B α , utilizando la β -actina como control de carga. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados.

Si analizamos la expresión de dianas de transcripción que se encuentran por debajo de la activación de IRF3 o NF- κ B como el IFN β , y algunas interleuquinas y quimioquinas como IL8, ccl-5 y cxcl-10, observamos que estas fueron inducidas de manera sinérgica después del tratamiento combinado con el 9cRA y el poly(I:C) (Figura 20). En el caso del IFN β , ni el 9cRA ni el poly(I:C) fueron capaces de inducir por sí solos la expresión de IFN β . Sin embargo, en el caso de las interleuquinas y quimioquinas, observamos una ligera inducción por el poly(I:C), que es potenciada cuando se tratan las

células conjuntamente con el 9cRA. Por el contrario, el tratamiento con el poly(A:U), no induce por sí solo la expresión de IL-8, ccl-5 y cxcl-10 ni coopera con el 9cRA para inducir la expresión de éstas y del IFN β en las células SK-BR-3. Estos datos sugieren que la apoptosis inducida por 9cRA/poly(I:C) se asocia con cambios tanto en la actividad de mediadores (IRF3 y NF- κ B) como en la expresión de dianas de transcripción de los “sensores” celulares para el *dsRNA*.

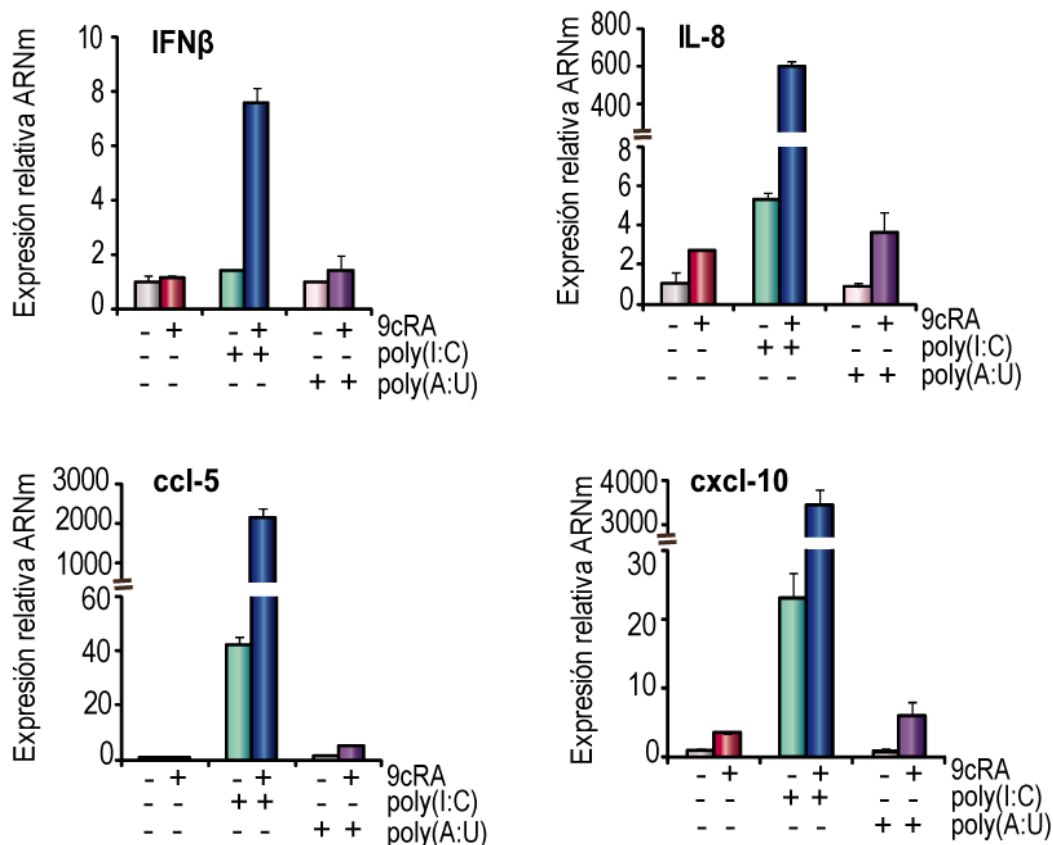


Figura 20. El 9cRA coopera con el poly(I:C) pero no con el poly(A:U) para regular la expresión de IFN β , IL-8, ccl-5 y cxcl-10 en las células SK-BR-3. Análisis mediante RT-qPCR de la expresión de los genes IFN β , IL-8, ccl-5 y cxcl-10 en células SK-BR-3 tratadas con vehículo, 9cRA y/o poly(I:C) o en su caso, poly(A:U) durante 24 horas. La expresión para cada gen fue normalizada con la expresión de la β -actina. Los valores representan la media \pm SD de un experimento representativo de tres experimentos realizados por duplicado.

2.7. La apoptosis inducida por el 9cRA en combinación con el poly(I:C) en la línea celular SK-BR-3 requiere la señalización por los interferones de tipo I

Los resultados anteriores sugerían que la apoptosis inducida por el tratamiento conjunto con el 9cRA y el poly(I:C), estaba asociada a un aumento en la expresión de entre otros, el interferón- β , el cual, potencialmente y de manera autocrina o paracrina podría estar participando en la señalización apoptótica inducida por 9cRA/poly(I:C). Sin embargo, cuando tratamos las células SK-BR-3 con IFN β recombinante, este fue incapaz de inducir la muerte celular en las células SK-BR-3, tanto solo como en combinación con el 9cRA, incluso cuando fue administrado a dosis altas (Figura 21A). Por el contrario, el IFN β recombinante coopera con el poly(I:C) para inducir la apoptosis de las células SK-BR-3. Para saber qué papel juegan la expresión y potencial secreción de los interferones de tipo I en la muerte celular inducida por el tratamiento conjunto con el 9cRA y el poly(I:C), se llevó a cabo la neutralización de los receptores de interferón de tipo I con anticuerpos monoclonales específicos en células control y en células que habían sido tratadas con el 9cRA en

combinación con el poly(I:C). Como se muestra en figura 21B, la neutralización de estos receptores redujo significativamente la apoptosis inducida por el 9cRA en combinación con el poly(I:C) en las células SK-BR-3, lo que demuestra que los IFNs de tipo-I son necesarios para la inducción de la muerte celular por la combinación de 9cRA y poly(I:C) (Figura 21B). Estos resultados sugieren que la señalización por los IFNs de tipo I es requerida para la muerte inducida por el 9cRA y el poly(I:C). Como hemos visto, aunque el IFN β es insuficiente para inducir la muerte celular por sí solo o en combinación con 9cRA, es capaz de cooperar con poly(I:C) para inducir la muerte celular en las células SK-BR-3. Por lo tanto, la señalización por los IFNs de tipo I y señales adicionales derivadas del tratamiento con el poly(I:C) parecen estar implicadas en la inducción de la apoptosis en las células SK-BR-3.

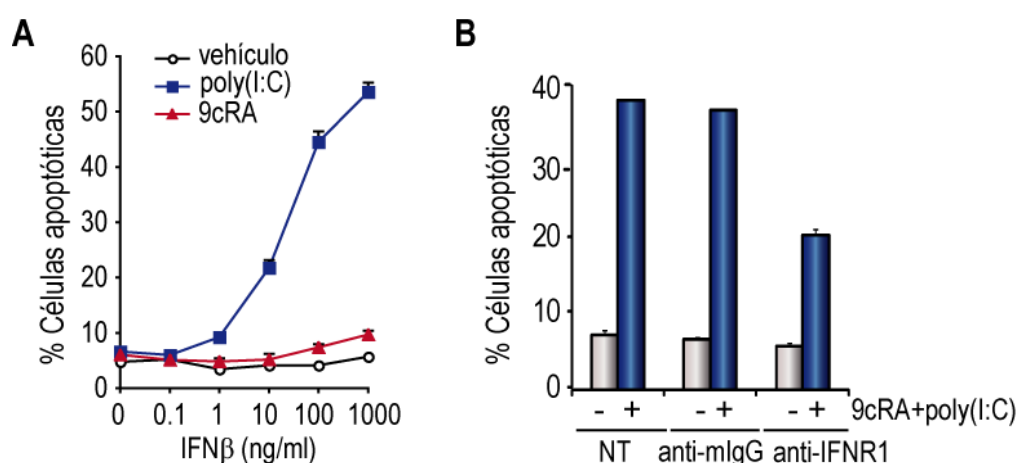


Figura 21. El bloqueo del receptor para los interferones de tipo I (IFNR1) suprime parcialmente la apoptosis inducida por el tratamiento con el 9cRA en combinación con el poly(I:C) en las células SK-BR-3. (A) Las células SK-BR-3 fueron tratadas con vehículo o 9cRA o poly(I:C) en presencia de cantidades crecientes de IFN β por 48 h. Se cuantificó la muerte celular mediante tinción con ioduro de propidio y el posterior análisis mediante citometría de flujo. Los valores representan la media \pm SD de un experimento representativo de tres independientes realizado por triplicado. (B) Las células SK-BR-3 no tratadas (NT) o pre-tratadas durante 1 h con un anticuerpo neutralizante del receptor de interferones tipo-I (anti-IFNR1) o un isotipo control (anti-mouseIgG) fueron incubadas en presencia de vehículo o 9cRA/poly(I:C), durante 48 h. Los anticuerpos fueron añadidos por segunda vez a las 24 h de iniciado el tratamiento. La muerte celular se cuantificó en las condiciones descritas en (A). Los datos mostrados representan la media \pm SD de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

2.8. El 9cRA y el poly(I:C) inducen sinérgicamente la expresión del ligando de muerte TRAIL en la línea celular de cáncer de mama SK-BR-3

Como mostramos anteriormente en la figura 16E, la vía extrínseca de la apoptosis se activa tras el tratamiento con el 9cRA y el poly(I:C) en las células SK-BR-3, ya que el tratamiento conjunto con estos dos agentes induce el procesamiento y por tanto la activación de la caspasa-8. TRAIL (*Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand*, también conocido como Apo2L y TNFSF10), un miembro de la familia TNF, es un ligando de muerte que desencadena la muerte celular a través de sus receptores DR4 y DR5 activando la vía extrínseca de la apoptosis (Ashkenazi, 2002). Dado que el AR, además de la diferenciación, está descrito que induce la apoptosis de las células de leucemia mediante la inducción de la expresión de TRAIL (Altucci and Gronemeyer, 2001), y por otro lado, TRAIL está implicado en la apoptosis inducida por el poly(I:C) en células endoteliales (Sun *et al.*, 2011), pensamos que TRAIL podría ser un mediador de la señalización proapoptótica inducida por 9cRA/poly(I:C) en las células de cáncer de mama. En efecto, como se ha descrito previamente, el 9cRA induce los niveles de ARNm de TRAIL, alrededor de 12 veces, en las células SK-BR-3, por otro lado, el

tratamiento con el poly(I:C) aumentó los niveles de ARNm de TRAIL de manera similar al 9cRA, sin embargo, el tratamiento conjunto con el 9cRA y el poly(I:C) llevó a una inducción sinérgica de la expresión de TRAIL, aumentando los niveles de ARNm en más de 1500 veces, algo que no ocurre cuando combinamos el 9cRA con el poly(A:U) (Figura 22A). Mediante ensayos de *western blot*, observamos que el aumento sinérgico de los niveles de proteína de TRAIL tras el tratamiento conjunto con el 9cRA y el poly(I:C), tiene lugar de manera dependiente del tiempo y se correlaciona con la activación de la caspasa-3 y de la caspasa-8 en las células SK-BR-3 (Figura 22B). Se obtuvieron resultados similares en las células de cáncer de mama ZR-75-1 con la única diferencia de que el poly(I:C) parece ser un mejor inductor de la expresión de TRAIL en estas células. Por lo tanto, estos resultados sugieren una asociación entre la apoptosis inducida por el tratamiento conjunto con 9cRA/poly(I:C) y la expresión de TRAIL.

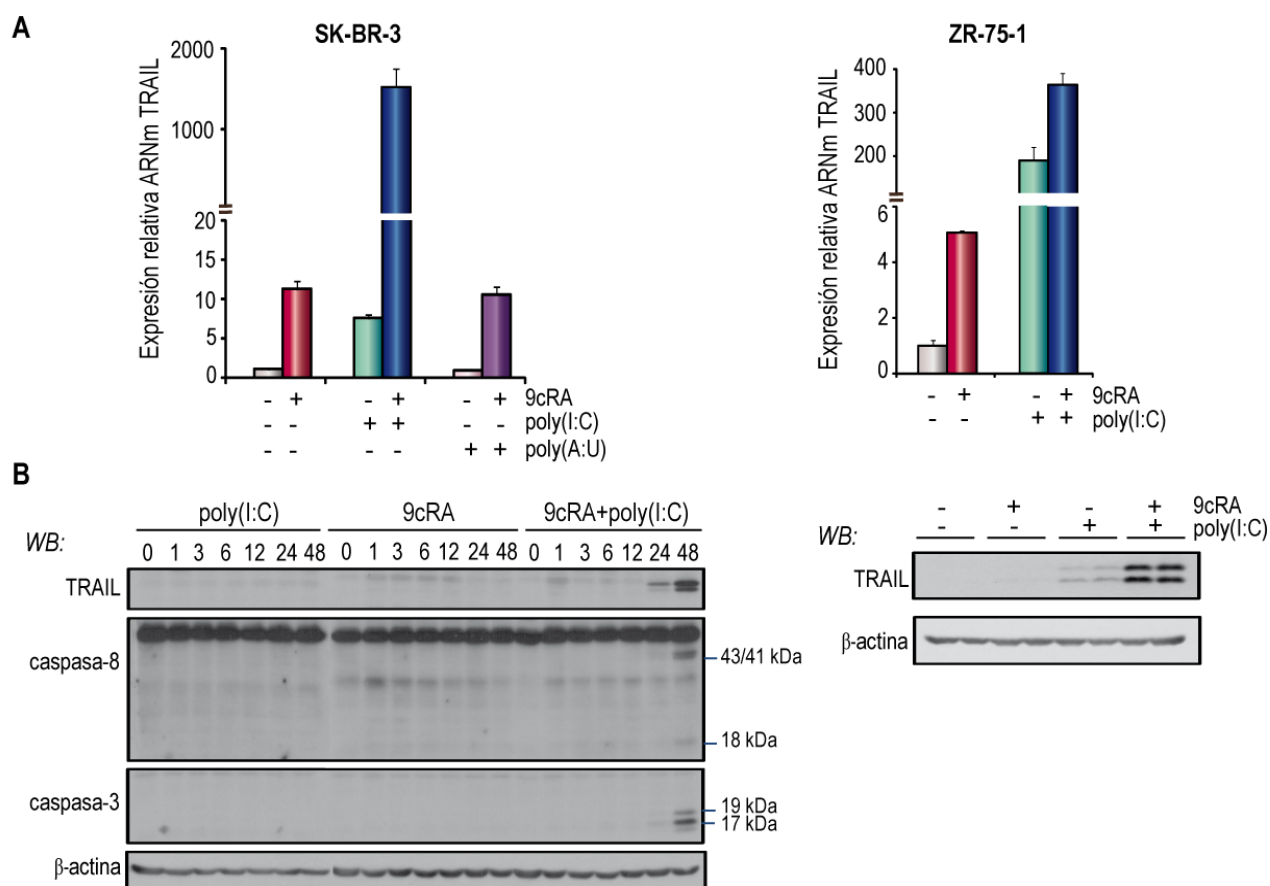


Figura 22. El 9cRA en combinación con el poly(I:C) inducen sinérgicamente la expresión del ligando de muerte TRAIL en las células de cáncer de mama SK-BR-3 y ZR-75-1. (A) Análisis de la expresión génica de TRAIL mediante RT-qPCR en las células SK-BR-3 (panel izquierdo) y ZR-75-1 (panel derecho) tratadas durante 24 horas en presencia de vehículo, 9cRA y/o poly(I:C) o como se indica poly(A:U) (sólo en el caso de la línea celular SK-BR-3). Los datos representan la media \pm SD de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por duplicado. (B) *Western blot* de los niveles de la proteína TRAIL, del procesamiento de la caspasa-8 y de la activación de la caspasa-3 utilizando β -actina como control de carga, en células SK-BR-3 (panel izquierdo) y de los niveles de TRAIL en las células ZR-75-1 (panel derecho) tratadas como se indica en la figura o durante 48 h en el caso de las células ZR-75-1. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes.

2.9. La inducción de la apoptosis por el tratamiento combinado con el 9cRA y el poly(I:C) es dependiente de TLR3 en las células SK-BR-3

PKR, MDA-5 y RIG-1 pueden ser activados por *dsRNA* sintéticos transfectados (Diebold *et al.*, 2003), mientras que TLR3 puede ser preferentemente activado por *dsRNA* exógeno (Matsumoto *et al.*, 2002). Dado que en nuestros experimentos el

poly(I:C) estaba siendo añadido a los cultivos de manera exógena, quisimos determinar el papel que juega TLR3 en la muerte celular inducida por el tratamiento conjunto con 9cRA y poly(I:C) en las células SK-BR-3. Los niveles de la proteína TLR3 fueron suprimidos específicamente a través de la transfección de *siRNAs* específicos dirigidos contra el ARNm de TLR3 (Figura 23A). Como se muestra en la figura 23B, el tratamiento combinado con estos dos agentes induce la muerte celular cuando las células fueron transfectadas con un *siRNA*-control mientras que la depleción de TLR3 tuvo como resultado la eliminación prácticamente en su totalidad de la inducción de la muerte celular por el tratamiento conjunto con 9cRA y el poly(I:C) (Figura 23B). Para corroborar los resultados anteriores, se comparó el nivel de activación de la caspasa-8 y de la caspasa-3 por *western blot*, como medida de la muerte celular, entre las células SK-BR-3 transfectadas con un *siRNA* control y las células SK-BR-3 transfectadas con un *siRNA* contra TLR3. Mientras que la activación de la caspasa-8 y -3 fueron inducidos por el tratamiento conjunto con el 9cRA y el poly(I:C) en las células transfectadas con el *siRNA*-control, la supresión de la proteína TLR3 abolió la activación de las caspasa-3 y de la caspasa-8 por 9cRA/poly(I:C). Curiosamente, la inducción de TRAIL por la combinación 9cRA/poly(I:C) fue completamente suprimida por la transfección del *siRNA*-TLR3. Estos resultados sugieren que (i) TLR3 está críticamente involucrado en la inducción de la apoptosis por el tratamiento conjunto con 9cRA/poly(I:C) en las células SK-BR-3 y (ii) TLR3 media la inducción del ligando de muerte TRAIL por la combinación 9cRA/poly(I:C) en las células SK-BR-3.

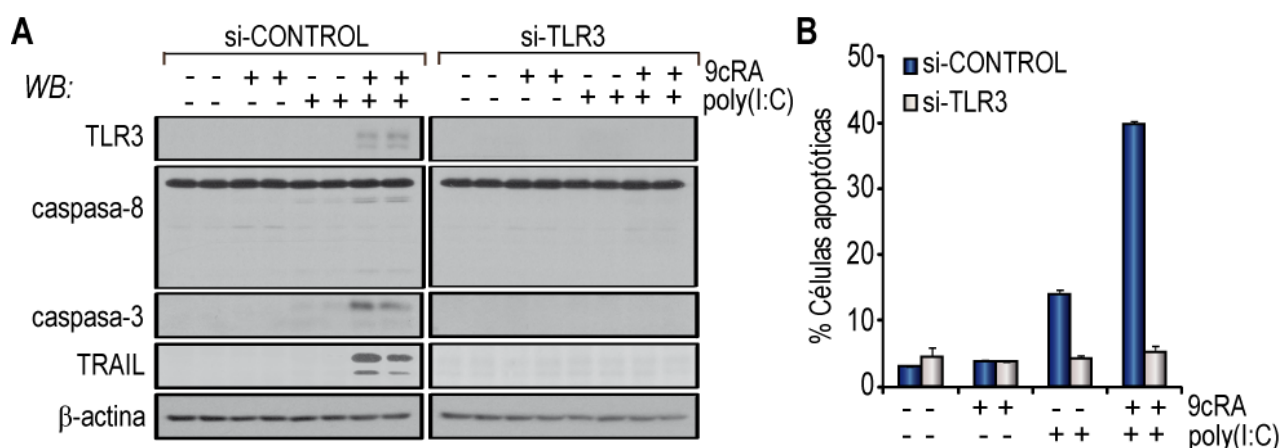


Figura 23. La inducción de la apoptosis y de la expresión de TRAIL por el 9cRA en combinación con el poly(I:C) es dependiente de TLR3 en las células SK-BR-3. (A) Análisis por *Western blot* de los niveles de las proteínas TLR3, TRAIL, y de la activación de la caspasa-8 y de la caspasa-3 en células SK-BR-3 transfectadas transitoriamente con un *siRNA*-control/scrambled o un *siRNA* específico contra TLR3, y tratadas con el 9cRA en presencia o ausencia de poly(I:C) o en su caso el vehículo por 24 h adicionales, tal y como se indica. Se utilizó los niveles de β-actina como control de carga en el experimento. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes. (B) Las células SK-BR-3 fueron transfectadas y tratadas como en (A). El porcentaje de células muertas se determinó mediante la tinción de éstas con yoduro de propidio y posterior análisis por citometría de flujo. Los datos representan la media ± SD de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

2.10. La inducción de la apoptosis por el tratamiento combinado con el 9cRA y el poly(I:C) es dependiente de IRF3 en las células SK-BR-3

Como hemos indicado anteriormente, la inducción de la apoptosis por el tratamiento conjunto con el 9cRA y el poly(I:C) en las células SK-BR-3 está asociado con la activación del factor de transcripción IRF3. Para determinar el papel que juega IRF3 en la muerte celular inducida por el tratamiento conjunto con el 9cRA y el poly(I:C) en células de cáncer de mama, los niveles de la proteína IRF3 fueron suprimidos específicamente mediante la transfección de *siRNAs* específicos dirigidos contra el ARNm de IRF3 (Figura 24A). La inhibición de la expresión de IRF3 tuvo como resultado la eliminación

prácticamente en su totalidad de la muerte celular inducida por el tratamiento conjunto con el 9cRA y el poly(I:C), mientras que el tratamiento con estos dos agentes indujo la muerte celular cuando las células fueron transfectadas con un *siRNA*-control o en condiciones en las que no transfectamos ningún *siRNA* (Figura 24B). Curiosamente, la inducción de TRAIL por la combinación de 9cRA/poly(I:C) fue completamente suprimida por la transfección del *siRNA* contra IRF3. Estos resultados revelan que (i) IRF3 está críticamente involucrado en la inducción de la apoptosis por el tratamiento conjunto con 9cRA/poly(I:C) en las células SK-BR-3 y (ii) IRF3 media la inducción del ligando de muerte TRAIL por la combinación 9cRA/poly(I:C) en las células SK-BR-3, reforzando la hipótesis de que TRAIL pueda ser uno de los mediadores de la apoptosis inducida por el 9cRA en combinación con el poly(I:C).

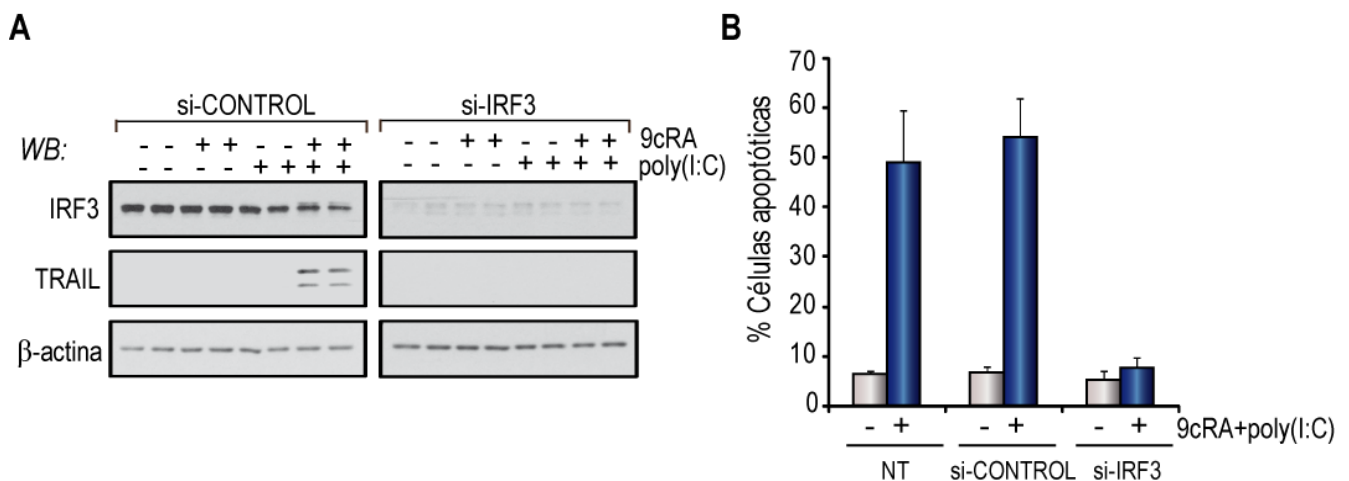


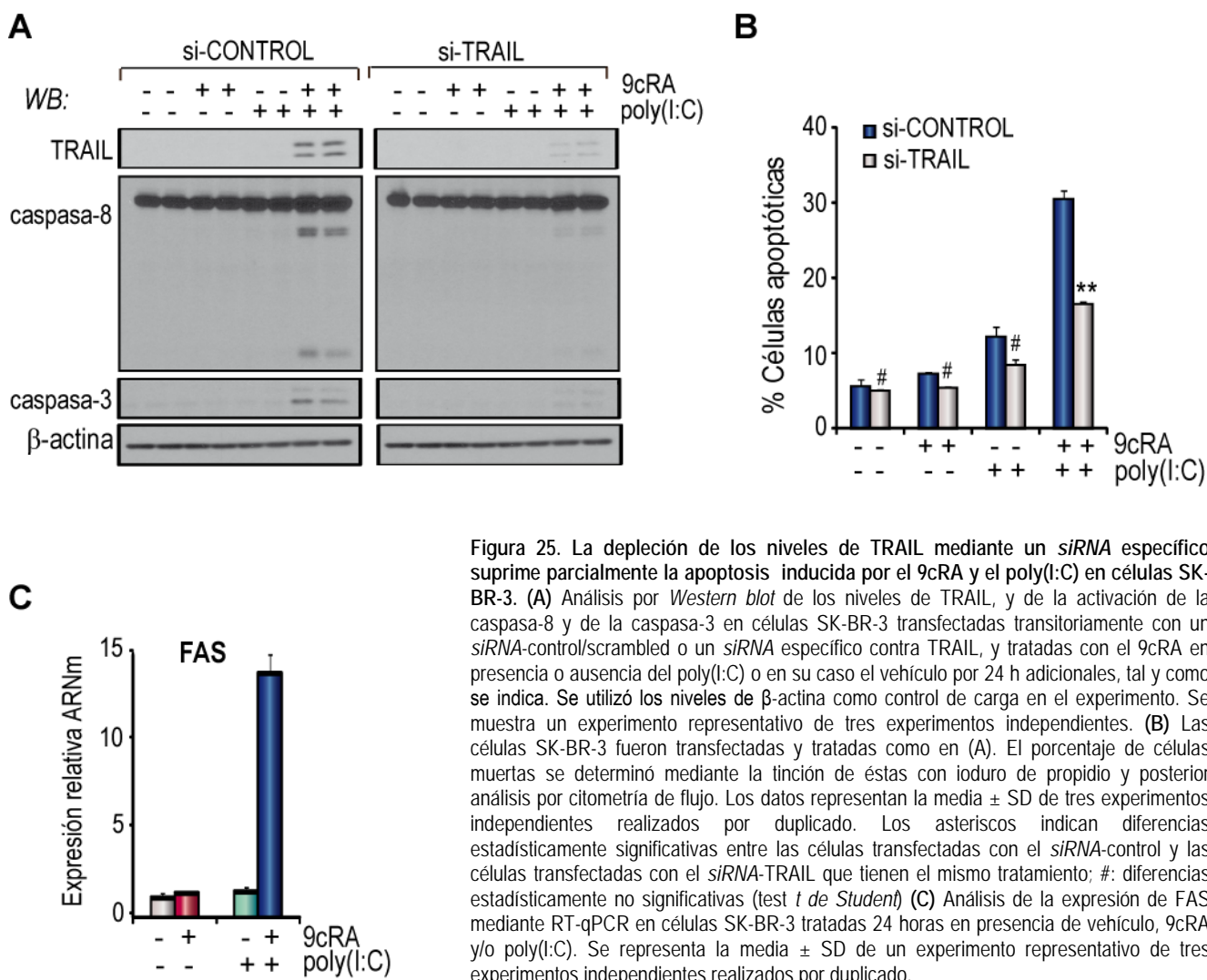
Figura 24. La inducción de la apoptosis y de la expresión de TRAIL por el tratamiento combinado con el 9cRA y el poly(I:C) es dependiente de IRF3 en las células SK-BR-3. (A) Análisis por *Western blot* de los niveles de la proteína IRF3 y de TRAIL en células SK-BR-3 transfectadas transitoriamente con un *siRNA*-control/scrambled o un *siRNA* específico contra IRF3, y tratadas con el 9cRA en presencia o ausencia del poly(I:C) o en su caso vehículo por 24 h, tal y como se indica. Se utilizó los niveles de β-actina como control de carga en el experimento. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes. (B) Las células SK-BR-3 sin transfectar (NT) o transfectadas con un *siRNA*-control (si-CONTROL) o un *siRNA* específico contra IRF3 (si-IRF3) fueron tratadas 24 h en presencia del vehículo o del 9cRA en combinación con el poly(I:C). La apoptosis se determinó mediante tinción por ioduro de propidio y posterior cuantificación por citometría de flujo, tal y como se relata en la sección de Materiales y Métodos. Los valores muestran la media ± SD de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

2.11. La inhibición de TRAIL suprime parcialmente la muerte inducida por el tratamiento combinado con el 9cRA y el poly(I:C) en las células de cáncer de mama SK-BR-3

Para determinar si la inducción de TRAIL está implicada en la apoptosis inducida por el 9cRA en combinación con el poly(I:C) en las células SK-BR-3, la expresión de la proteína TRAIL fue inhibida a través de la transfección de *siRNAs* específicos (Figura 25A). La apoptosis inducida por el 9cRA y el poly(I:C) fue inhibida aproximadamente un 50% cuando los niveles de la proteína TRAIL fueron suprimidos mediante la transfección del *siRNA*-TRAIL (Figura 25B). Para validar los resultados anteriores, comparamos el nivel de activación de la caspasa-8 y -3 por *western blot* entre las células SK-BR-3 que habían sido transfectadas con un *siRNA*-control y las que habían sido transfectadas con un *siRNA* específicamente dirigido contra el ARNm de TRAIL. Mientras que los niveles de activación de las caspasas-8 y -3 fueron inducidos por el tratamiento conjunto con el 9cRA y el poly(I:C) en las células transfectadas con el *siRNA*-control (activación de las caspasas medida por el grado de procesamiento de las mismas), la supresión del ligando de muerte TRAIL inhibe

parcialmente la activación de la caspasa-8 y la caspasa-3 por el 9cRA y el poly(I:C). Estos resultados indican que TRAIL está involucrado en la apoptosis inducida por el 9cRA y el poly(I:C) en las células SK-BR-3.

El hecho de que el *siRNA* contra TRAIL bloquee parcialmente la apoptosis inducida por 9cRA y poly(I:C) sugiere que probablemente otros mediadores pro-apoptóticos, diana de la acción de TLR3 e IRF3 también pueden contribuir a la muerte celular inducida por el 9cRA en combinación con el poly(I:C) en las células de cáncer de mama SK-BR-3. En relación a esto último, cuantificamos los niveles de expresión del receptor de muerte FAS para ver si otros receptores o ligandos de muerte podían estar también regulados por la combinación 9cRA/poly(I:C) y estar por tanto, potencialmente implicados en la inducción de la apoptosis por el 9cRA en combinación con el poly(I:C) (Figura 25C). Como se muestra en la figura 25C, el tratamiento conjunto con el 9cRA y el poly(I:C) induce la expresión del receptor FAS de manera sinérgica, alrededor de 13 veces, mientras cada uno de estos agentes por sí solo no tiene efectos significativos sobre la expresión de este receptor. Estos resultados muestran que la expresión del receptor FAS está regulada por el tratamiento simultáneo con el 9cRA y el poly(I:C), como ocurre en el caso del ligando de muerte TRAIL, sugiriendo su potencial implicación en la muerte celular inducida por el 9cRA y el poly(I:C) en las células SK-BR-3.



El cáncer hace referencia a un amplio grupo de más de un centenar de enfermedades diferentes, que se origina por una combinación de alteraciones genéticas y epigenéticas, y que sólo comparten como característica común una proliferación incontrolada de células anormales. En la actualidad, el cáncer es la segunda causa de muerte en los países desarrollados, siendo el cáncer de mama uno de los más comunes en la población femenina. Aproximadamente entre un 10 y un 15 % de mujeres en el mundo se le diagnosticará cáncer de mama a lo largo de su vida. En este tipo de cáncer, la terapia anti-hormonal con tamoxifeno, la deprivación hormonal o los inhibidores de aromatasas son efectivos en pacientes post-menopáusicas en estadio temprano de la enfermedad. Sin embargo, las únicas opciones en estadios más avanzados de la enfermedad son la radioterapia y la quimioterapia.

Actualmente, los retinoides, solos o en combinación con otros agentes terapéuticos, están siendo usados con gran éxito en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer (i.e. leucemia promielocítica aguda) y su eficacia y seguridad están siendo evaluadas en el tratamiento y la prevención del cáncer de mama. La capacidad de los retinoides de inhibir la proliferación, inducir la diferenciación y en algunos casos promover la apoptosis es la base de su uso en oncología (Niles, 2004). Sin embargo, a pesar de que los retinoides poseen en numerosas células tumorales *in vitro* una potente actividad antitumoral, el uso efectivo de los mismos es bastante limitado en el caso del tratamiento de tumores sólidos. Además, la toxicidad asociada a la dosis necesaria para obtener una eficacia óptima limita su utilización. Actualmente, se trata de eliminar o disminuir los efectos adversos de los retinoides mediante el diseño de agonistas específicos de los receptores de retinoides, así se ha logrado generar múltiples compuestos con fines terapéuticos que han mejorado la eficacia y disminuido los efectos secundarios de los retinoides (Barnard *et al.*, 2009; de Lera *et al.*, 2007). Otro modo de disminuir los efectos tóxicos de los retinoides manteniendo sus efectos positivos consiste en disminuir la dosis utilizada y combinar a estos con otro tipo de tratamientos antitumorales. Hoy por hoy, las terapias de combinación con retinoides son objeto de estudio para mejorar la eficacia de los retinoides en el tratamiento y la prevención del cáncer de mama. En el caso del cáncer de mama, una de las combinaciones más estudiadas es la que implica a los retinoides y el interferón. Está ampliamente admitido el efecto antiproliferativo del tratamiento con retinoides en células de cáncer de mama y además, la combinación de los retinoides y el interferón presenta un potente efecto antiproliferativo en células de cáncer de mama tanto *in vitro* como *in vivo* (Lindner *et al.*, 1997; Widschwendter *et al.*, 1997a; Widschwendter *et al.*, 1996). Asimismo, se han obtenido resultados prometedores en ensayos clínicos en fase II de cáncer metastásico de mama después del tratamiento con retinoides en forma de palmitato de retinol, en combinación con el interferón y junto con el tamoxifeno (Recchia *et al.*, 2009). En nuestro trabajo, hemos abordado el estudio de los efectos antitumorales del AR solo o en combinación con el IFN γ en líneas celulares de cáncer de mama humano, profundizando además en los mecanismos moleculares que subyacen a estos efectos. Nuestros resultados sugieren que la inhibición de la proliferación por la acción del AR en combinación con el IFN γ se asocia con la inducción de la expresión de cIAP2 en diversos modelos celulares *in vitro* de cáncer de mama humano. Mediante experimentos de mapeo y de mutagénesis del promotor de cIAP2, hemos determinado que el AR y el IFN γ inducen la expresión de cIAP2 a través de la interferencia o el "crosstalk" con NF- κ B. En las células SK-BR-3, se ha descrito previamente que el AR y el IFN γ inducen la expresión de genes proapoptóticos (i.e. TRAIL, *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) aunque la expresión de estos genes se asocia con una escasa inducción de la apoptosis en este y otros sistemas celulares analizados. La expresión paralela de programas antiapoptóticos y en concreto de cIAP2, podría explicar la escasa inducción de apoptosis por parte del AR y el IFN γ en estos sistemas

celulares; sin embargo la depleción de cIAP2 mediante la transfección de un ARN interferente no altera la sensibilidad de las células SK-BR-3 a los efectos proapoptóticos del AR en combinación con el IFN γ .

Por otra parte, la inhibición de la proliferación por la acción del AR en combinación con el IFN γ se asocia con la inducción de la expresión de TLR3 en diversos sistemas celulares de cáncer de mama. Además, nuestros estudios revelan que el AR, por sí solo, induce la expresión de TLR3 en células de cáncer de mama. TLR3 es un miembro de la familia de receptores del sistema inmune innato que reconocen ARN de doble cadena, y que recientemente ha sido reconocido como diana molecular para el tratamiento del cáncer, ya que es capaz de inducir la apoptosis en diferentes tipos de células tumorales. El poly(I:C), un análogo sintético de ARN de cadena doble y un ligando para TLR3, es capaz de inducir la apoptosis en distintos tipos de células tumorales humanas y ha sido usado como adyuvante en la terapia del cáncer. Nuestros resultados demuestran que la combinación del AR con el poly(I:C) inhibe el crecimiento e induce la apoptosis en células de cáncer de mama de manera dependiente de TLR3 y del factor de transcripción IRF3. Además, en este proceso está involucrada la señalización autocrina de los interferones de tipo I, la activación de la caspasa-8 y la caspasa-3, y la expresión y la actividad del ligando de muerte TRAIL (Figura 26). Desde un punto de vista terapéutico, nuestros resultados abogan por terapias combinadas a base de retinoides y agonistas de TLR3 para erradicar las células tumorales.

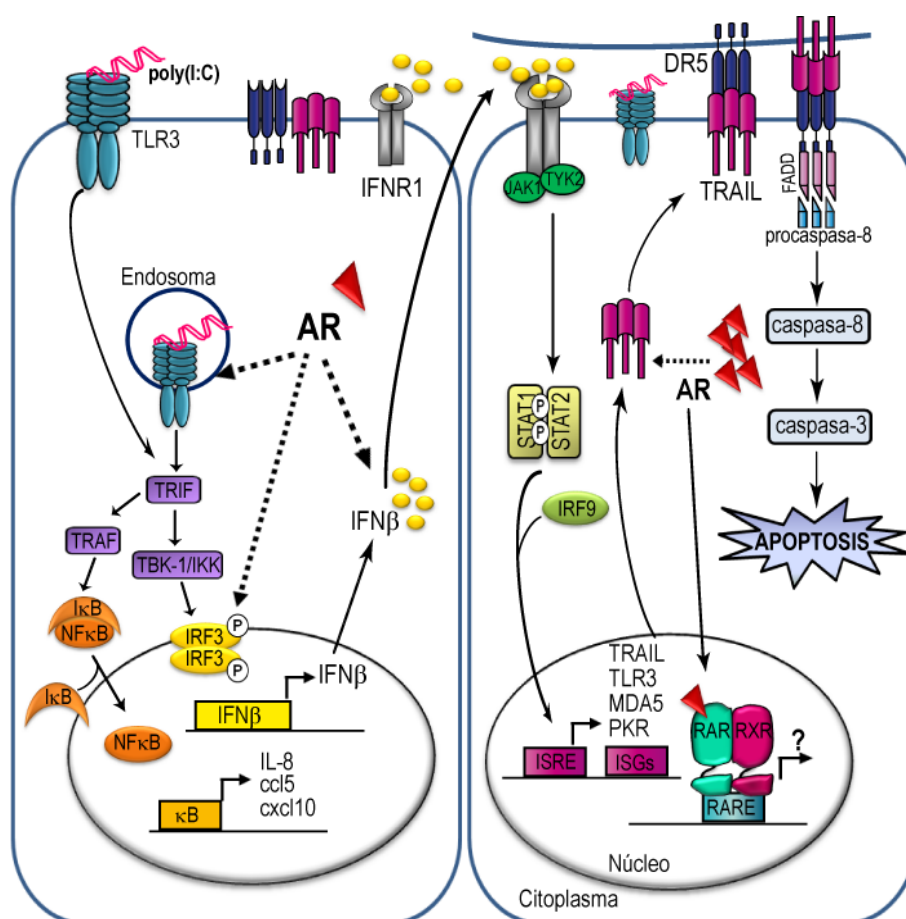


Figura 26. Modelo del mecanismo de inducción de la muerte celular por la combinación del AR y el poly(I:C) en células de cáncer de mama.

1. Inducción de programas antiapoptóticos por el AR y el IFN γ en células de cáncer de mama: regulación transcripcional de cIAP2 por el AR y el IFN γ

Actualmente, se conoce poco acerca de los programas transcripcionales implicados en los efectos antiproliferativos del AR y el IFN γ en células de cáncer de mama. Nuestros resultados demuestran que el AR y el IFN γ inducen de manera sinérgica la expresión de cIAP2, un miembro de la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) en diferentes sistemas celulares de cáncer de mama. Mediante ensayos de mapeo del promotor y de mutagénesis dirigida hemos demostrado que la regulación transcripcional de cIAP2 en respuesta al tratamiento con AR/IFN γ se produce, principalmente, a través de sitios de unión para el factor de transcripción NF- κ B. Además, los sitios de unión para los factores de transcripción c-JUN e IRFs estarían implicados en la regulación transcripcional de cIAP2 por AR/IFN γ . Sorprendentemente, los resultados obtenidos estudiando la activación transcripcional de cIAP2 por AR/IFN γ son semejantes a los resultados previos obtenidos por nuestro grupo en los que se analizaba la activación transcripcional de cIAP2 por el AR solamente (Jimenez-Lara *et al.*, 2010). Creemos que harán falta más estudios para determinar en detalle si la vía de transducción que lleva a la regulación de cIAP2 es la misma en ambos casos o por el contrario existen diferencias. De acuerdo con nuestros datos, en la literatura existen diversos trabajos que demuestran que el AR induce la unión de NF- κ B tanto *in vitro* como *in vivo* a elementos de respuesta consenso para este factor en células de cáncer de mama y de leucemia (Altucci *et al.*, 2001; Jimenez-Lara *et al.*, 2010). Nuestros resultados son apoyados por otros estudios que demuestran que el AR regula la actividad transcripcional de NF- κ B en células de leucemia y en neuroblastoma (Feng and Porter, 1999; Mathieu *et al.*, 2005; Witcher *et al.*, 2003). Asimismo, se ha descrito la activación de NF- κ B por el AR a través de la interferencia con la vía de señalización PI3K/AKT en células humanas de neuroblastoma (Lopez-Carballo *et al.*, 2002). Por otro lado, se han descrito interacciones proteína-proteína entre el receptor de retinoides RXR y p50/p65 que podrían contribuir a la activación de estos últimos (Na *et al.*, 1999). Por su parte, el IFN γ regula indirectamente la actividad de NF- κ B, modulando la expresión de la proteína quinasa PKR, un mediador importante de las acciones de los interferones (Deb *et al.*, 2001). En definitiva, existen diversos trabajos en la literatura que han demostrado la activación de NF- κ B en respuesta al tratamiento con el AR o con el IFN γ . Nuestros resultados demuestran la importancia de los sitios de unión de NF- κ B en el promotor de cIAP2 para la activación transcripcional inducida por AR/IFN γ en células de cáncer de mama. Serán necesarios más estudios en el futuro para conocer en profundidad la potencial regulación de NF- κ B en la regulación transcripcional de cIAP2 por la combinación AR/IFN γ .

La sobreexpresión de las proteínas IAPs se correlaciona con la supervivencia, la tumorigénesis y la resistencia a la apoptosis (revisado en (Altieri, 2003)) y están implicadas en la progresión de la enfermedad y su mal pronóstico (Hunter *et al.*, 2007; LaCasse *et al.*, 1998). Concretamente, la sobreexpresión de cIAP2 inhibe la apoptosis y el procesamiento de la caspasa-3 inducida por el etopósido en las células 293T (Roy *et al.*, 1997) y en las células HT1080 cuando NF- κ B está ausente (Wang *et al.*, 1998). También, la expresión de la survivina inhibe la apoptosis en carcinoma de mama y esta es considerada un marcador terapéutico para este tipo de cáncer (Tanaka *et al.*, 2000). Se conoce, que los retinoides son reconocidos moduladores de diversas proteínas IAPs. En relación con esto, el AR disminuye de modo acentuado la expresión de proteínas antiapoptóticas, lo cual se correlaciona con los efectos apoptóticos del AR. Por ejemplo, la apoptosis inducida por retinoides en células de cáncer de mama se asocia con una disminución marcada de Bcl-2 y survivina (Pratt *et al.*, 2003). De igual modo, la apoptosis de células de neuroblastoma tratadas con retinoides se

correlaciona con la disminución de la expresión de Bcl-2 (Niizuma *et al.*, 2006). Otros estudios demuestran que los retinoides en combinación con el IFN γ inducen la muerte de células de glioblastoma por la disminución marcada de la proteína antiapoptótica Bcl-2, de modo simultáneo al aumento de la expresión de la proteína proapoptótica Bax (Zhang *et al.*, 2008). En general, la inhibición de las IAPs aumenta el efecto apoptótico de agentes quimioterapéuticos, como cisplatino y etopósido, además de sensibilizar a las células tumorales a la muerte por TRAIL (McManus *et al.*, 2004; Tong *et al.*, 2005). De modo que diversos estudios proponen a las IAPs, cIAP2 entre otras, responsables de la resistencia a TRAIL en células tumorales humanas (Cummins *et al.*, 2004; Ricci *et al.*, 2007).

Como hemos descrito previamente, la sobreexpresión de IAPs se correlaciona con la supervivencia celular y la resistencia a la apoptosis, por lo que en base a nuestros resultados supusimos que los programas antiapoptóticos podrían estar anulando los programas proapoptóticos en las células de cáncer de mama tratadas con el AR y el IFN γ . En nuestro estudio, la activación de cIAP2 resulta paradójica, ya que había sido descrito previamente que el tratamiento combinado con el AR y el IFN γ induce genes de función opuesta como es el gen TRAIL, un gen de reconocido carácter proapoptótico. Además, esta combinación de agentes induce una débil apoptosis en las células de cáncer de mama SK-BR-3, a pesar de que en otros contextos celulares es capaz de inducir apoptosis. Así, cIAP2 surgía como un posible candidato responsable de la escasa inducción de apoptosis por parte de la combinación AR/IFN γ , a pesar de la inducción de TRAIL. Para comprobar esta hipótesis, realizamos estudios de interferencia con *siRNAs* para suprimir selectivamente la expresión de cIAP2. Sin embargo, en estas condiciones la ausencia de cIAP2 no sensibiliza las células SK-BR-3 a la acción proapoptótica de la combinación AR/IFN γ , a pesar de la eficaz inhibición de la expresión de cIAP2. Nuestros resultados claramente demuestran que cIAP2 no juega un papel inhibidor de la apoptosis en las células SK-BR-3 tratadas con AR/IFN γ , sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que la expresión de otros miembros de la familia IAPs pueda compensar la ausencia de cIAP2 en nuestro sistema, lo que explicaría la falta de efecto de la inhibición de la expresión de cIAP2. Alternativamente, y dado que siguen apareciendo nuevas funciones para las proteínas IAPs, cIAP2 podría tener un papel más complejo de lo que podíamos anticipar y estaría regulando otro tipo de procesos biológicos. Se requerirán más estudios para desvelar el papel exacto de cIAP2 en los efectos inducidos por la combinación AR/IFN γ en las células de cáncer de mama.

En la actualidad, hay múltiples estrategias terapéuticas que tienen como objetivo aumentar la sensibilidad de las células tumorales a TRAIL mediante la regulación de la expresión de las IAPs. Diversos agentes quimioterapéuticos como inhibidores de HDAC (Guo *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2003), cicloheximida (Kang *et al.*, 2003), Mesilato de Imatinib (inhibidor de la proteína tirosina kinasa) (Nimmanapalli *et al.*, 2001), inhibidores del proteosoma (Hougardy *et al.*, 2006), 17-AAG (inhibidor de Hsp90) (Vasilevskaya and O'Dwyer, 2005), trióxido arsénico (Kerbaui *et al.*, 2005) y antagonistas de XIAP (Karikari *et al.*, 2007) están siendo probados con éxito en el bloqueo de las IAPs para superar la resistencia a TRAIL en líneas celulares de cáncer de mama, colon, páncreas, melanoma, cervical y leucemia. Particularmente, en células de cáncer de mama se ha demostrado que la terapia de combinación con antagonistas de IAPs y algunos agentes proapoptóticos, como por ejemplo TRAIL, incrementa la apoptosis celular (Foster *et al.*, 2009).

2. Regulación de la expresión de TLR3 por el AR solo o en combinación con el IFN γ en células de cáncer de mama

Actualmente, el tratamiento combinado con el AR y el IFN γ solo o en combinación con otros agentes está siendo evaluado en diferentes ensayos clínicos para determinar su potencial uso como terapia antitumoral en diferentes tipos de cáncer como neoplasias linfoides, sarcoma de Kaposi y cáncer metastásico de mama (Recchia *et al.*, 2009; Somos and Farkas, 2000; Tsimberidou *et al.*, 2004). Diversos estudios preclínicos han demostrado el efecto inmunomodulador y antitumoral del tratamiento con AR/IFN γ tanto en ensayos *in vitro* como en animales de experimentación (Fanjul *et al.*, 1996). Hoy en día, existe un gran interés por conocer los circuitos transcripcionales que subyacen a los efectos del tratamiento combinado con el AR y el IFN γ en diversos sistemas celulares tumorales. Hasta ahora se han identificado las proteínas GRIMs (Lindner *et al.*, 2002; Lufei *et al.*, 2003), XAF-1 (Liston *et al.*, 2001) y TRAIL (Clarke *et al.*, 2004b) como posibles mediadores de los efectos antitumorales que presenta el AR en combinación con el IFN γ . Los resultados de este estudio demuestran que el AR sinergiza con el IFN γ para controlar la expresión de TLR3, pero más interesante aún, es el hecho de que el AR por sí solo es también capaz de inducir la expresión de este receptor. Estos datos sugerían que TLR3 podría tener un potencial papel mediador de la acción del AR en combinación con el IFN γ en las células de cáncer de mama, y que, además, podría existir una potencial interacción funcional entre el AR y agonistas para el receptor TLR3 en las células de cáncer de mama. Actualmente se conoce que los IFNs son capaces de regular TLR3, pero hasta el momento no se ha descrito que la expresión de TLR3 esté regulada por el AR. Este estudio es el primero en describir que TLR3 es un gen diana para el AR. TLR3 pertenece a la familia de los TLRs, cuya función es la detección de patrones moleculares de diferentes patógenos desencadenando la correspondiente respuesta inmunitaria. TLR3 fue uno de los primeros TLRs identificados, y ya que reconoce ARN de doble cadena, desde el principio se ha asumido que el TLR3 juega un papel importante en la respuesta del huésped frente a la infección viral. La activación de TLR3 desencadena una potente respuesta inmune Th1 que implica un aumento de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y de interferones, llevando a la maduración, diferenciación y proliferación de las células inmunitarias. Debido a que los efectos inducidos sobre el sistema inmune facilitan la eliminación tanto de células infectadas por virus como de células tumorales, pronto se consideró la posibilidad de incluir activadores del receptor TLR3 como adyuvantes en el tratamiento de determinados tipos de cáncer para potenciar la respuesta inmunitaria contra el tumor. Además de la expresión de TLR3 en las células inmunes, se ha descrito recientemente que ciertos tipos de células tumorales humanas expresan este receptor, sugiriendo que agonistas de TLR3 además de poseer efectos en el sistema inmune, pueden inducir directamente apoptosis en el propio tumor (Salaun *et al.*, 2006; Khvalevsky *et al.*, 2007). Así, se ha encontrado que determinados tipos de células de cáncer de mama expresan este receptor, así como células de melanoma y su expresión se induce por los IFNs. Centrando nuestra atención en la regulación de la expresión de TLR3 por el AR, nuestros resultados revelan que la regulación transcripcional de TLR3 por el AR es indirecta o depende de la síntesis de factores de transcripción intermediarios de vida corta que median su acción, ya que la incubación con el inhibidor de la síntesis de proteínas, cicloheximida, inhibe la inducción del ARNm de TLR3 por el AR. Se ha descrito previamente que la secuencia del promotor humano de TLR3 contiene sitios de unión para factores regulados por interferones, concretamente un elemento de unión ISRE/IRFE (*Interferon-Stimulated Response Element/Interferon Regulatory Factor Binding Site*) y un elemento de unión a STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) (Heinz *et al.*, 2003). El AR podría estar regulando la expresión de TLR3 a través de estos sitios,

ya que se conoce que el AR regula la transcripción y la actividad de factores de transcripción como IRF1 o STAT1 en células de cáncer de mama, incluyendo las células SK-BR-3 y otros sistemas celulares (Clarke *et al.*, 2004b; Dimberg *et al.*, 2000). La regulación de IRF1 por el AR ha sido ampliamente demostrada en diversos sistemas tumorales *in vitro* (Gianni *et al.*, 1997; Matikainen *et al.*, 1996; Pelicano *et al.*, 1997; Percario *et al.*, 1999; Um *et al.*, 2000). En base a nuestros resultados y acorde con la literatura sugerimos un posible mecanismo de regulación de la expresión de TLR3 por AR dependiente de la síntesis y/o actividad de IRF1 o STAT1 y su posterior unión a los elementos de respuesta consenso ISRE/IRFE presentes en el promotor de TLR3. Experimentos adicionales serían necesarios para conocer con detalle los factores de transcripción que median los efectos del AR en la expresión de TLR3, pues no se puede descartar el papel de otros factores de transcripción que pudieran ser reclutados *in vivo* al promotor de TLR3 regulando su transactivación en respuesta al AR.

3. Inducción de la apoptosis por el AR y el poly(I:C) en las células de cáncer de mama

Los agonistas de TLR3 han sido evaluados en diferentes ensayos clínicos debido a sus propiedades antitumorales (Kanzler *et al.*, 2007; Krieg, 2008). En la actualidad, los agonistas de TLR3 están siendo usados con moderado éxito como adyuvantes de terapia para diferentes tipos de cáncer, incluyendo el carcinoma de mama, con el objetivo de potenciar una respuesta inmune antitumoral. El poly(I:C) es un análogo sintético de los *dsRNA* y un agonista de TLR3, que está siendo usado con moderado éxito en ensayos clínicos de fase III, como adyuvante de vacunas en la terapia del cáncer, por sus potentes efectos inmunoadyuvantes debido a su capacidad de inducir una respuesta inmune mediada por células Th1, promover la generación de células dendríticas presentadoras de antígenos y actuar directamente sobre las células efectoras T CD8+ y *natural killer* estimulando la liberación de IFN γ . Además, representa una atractiva opción terapéutica por la posibilidad de inducir una inmunidad duradera gracias a su eficacia y a su favorable perfil de seguridad. Hoy en día, el desarrollo de análogos sintéticos de poly(I:C) es un tema al que se le está dedicando mucho esfuerzo en los últimos años. Actualmente, se encuentran en ensayos preclínicos dos compuestos que son modificaciones del polímero poly(I:C), denominados IPH3102 y Ampligen. El IPH3102, *dsRNA* sintético de alto peso molecular, es un agonista específico de TLR3 que promueve la señalización de NF- κ B y la respuesta de IFNs de tipo I destruyendo las células de cáncer de mama y melanoma *in vitro*. Además, IPH3102 actúa como un potente estimulador del sistema inmune *in vivo* en ratones (Panter *et al.*, 2009). Este candidato a droga basado en *dsRNA* ha sido desarrollado por los laboratorios Innate Pharma para el tratamiento del cáncer de mama y como adyuvante en vacunas. Otra potencial droga que ha resultado ser prometedora en la inmunoterapia del cáncer es un mimético sintético del *dsRNA* poly(I:C) denominado Ampligen, también conocido como polyI:polyC₁₂U. Esta droga inmunomoduladora está siendo desarrollada por Hemispherx Biopharma para el tratamiento del síndrome de la fatiga crónica, hepatitis B y C, VIH y el cáncer (Jasani *et al.*, 2009; Nicodemus *et al.*, 2010). El otro análogo sintético del *dsRNA*, denominado poly(A:U), también ha sido ampliamente estudiado en ensayos preclínicos y clínicos. El poly(A:U) se ha usado como agente monoterapéutico con moderado éxito en la terapia del cáncer de mama y cáncer gástrico (Jeung *et al.*, 2008; Laplanche *et al.*, 2000). Análisis retrospectivos demostraron que la administración post-operatoria de poly(A:U) mejoraba el ratio de supervivencia de aquellos pacientes de cáncer de mama que sobreexpresaban TLR3 (Andre *et al.*, 2008). En otra reevaluación del ensayo clínico se demostró que el poly(A:U), solo o en combinación, mejoraba significativamente la supervivencia de pacientes con cáncer de mama operable y reducía

significativamente la incidencia de metástasis (Lacour *et al.*, 1991; Laplanche *et al.*, 2000). Estos estudios y otros más recientes, además de demostrar la correlación existente entre la inyección de agonistas para TLR3 y el incremento del ratio de supervivencia en los pacientes, han demostrado además cierta correlación con la expresión del receptor funcional TLR3 en células de cáncer de mama primarias y metastásicas (Andre *et al.*, 2006; Salaun *et al.*, 2006). Como antes adelantábamos, recientemente mediante ensayos inmunohistoquímicos se ha demostrado la expresión de TLR3 en células de cáncer de mama y melanoma (Salaun *et al.*, 2011). Numerosas evidencias han demostrado que los agonistas de TLR3 presentan efectos antiproliferativos y pro-apoptóticos en células tumorales por sí mismos o cuando se combinan con inhibidores de la síntesis de proteínas o con IFNs de tipo I (Friboulet *et al.*, 2010; Salaun *et al.*, 2007a; Weber *et al.*, 2010). Concretamente, los efectos antitumorales del poly(I:C) han resultado prometedores en la terapia de diversos modelos *in vitro* de cáncer de cérvix, próstata, melanoma, hepatocarcinoma y tumores hematopoyéticos, desencadenando una respuesta antiproliferativa y pro-apoptótica (Jiang *et al.*, 2008; Paone *et al.*, 2008; Salaun *et al.*, 2007a; Smits *et al.*, 2007; Vercammen *et al.*, 2008a; Yoneda *et al.*, 2008). En particular, ensayos en cultivo *in vitro* de cáncer de mama indican que la activación del receptor TLR3 por el poly(I:C) induce directamente la apoptosis dependiente de la señalización autocrina de los IFNs tipo I (Salaun *et al.*, 2006). Asimismo, TLR3 es el principal responsable de la inhibición de la proliferación y la inducción de la apoptosis en cultivos *in vitro* de cáncer de próstata en respuesta al poly(I:C) (Paone *et al.*, 2008). Más recientemente, se ha descrito que el tratamiento con el poly(I:C) induce la muerte dependiente de TLR3 en células de melanoma y neuroblastoma (Chuang *et al.*, 2011; Weber *et al.*, 2010). Sin embargo, el mecanismo exacto de la señalización apoptótica mediada por TLR3 aún no se conoce con total exactitud.

A pesar de los estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo* que sugieren que el AR puede tener efectos terapéuticos para el cáncer de mama, el uso del AR es limitado debido a una serie de problemas, que incluyen una toxicidad sistémica grave y la generación de resistencia. Así pues, existe un especial interés en encontrar compuestos que puedan cooperar con el AR para así mejorar sus efectos anticancerosos y disminuir sus efectos negativos, ya que en terapia combinada las dosis se reducen considerablemente y por tanto sus efectos negativos son menores. En base a nuestros resultados que demuestran que la expresión de TLR3 está controlada por el AR, formulamos la hipótesis de que el AR por su capacidad para modular la expresión de TLR3 podría sensibilizar a las células de cáncer de mama, que inicialmente no pudieran responder a agonistas de TLR3, a los efectos proapoptogénicos de agonistas para este receptor. En nuestro estudio, hemos demostrado que el AR, por sí mismo, no induce muerte celular de manera significativa en las células de cáncer de mama analizadas, pero coopera de forma aditiva o sinérgica con el poly(I:C), un agonista de TLR3, para inducir la muerte celular. Nuestros datos, utilizando diferentes modelos celulares de cáncer de mama, demuestran que el cotratamiento con el AR en combinación con el poly(I:C) induce la apoptosis de manera dependiente del contexto celular. En el caso de las células Hs 578T, la combinación AR/poly(I:C) solamente induce la apoptosis en presencia del inhibidor de la síntesis de proteínas CHX. La incubación con CHX sensibilizó las células al tratamiento combinado con ambos agentes mientras que no afectó al tratamiento con AR o poly(I:C) por separado. Estos resultados sugieren que la expresión de un inhibidor o inhibidores de la muerte celular, que dependen de la síntesis de proteínas están bloqueando la muerte celular inducida por la combinación AR/poly(I:C) en este contexto celular. Sin embargo, la incubación con CHX no fue suficiente para inducir apoptosis en las células H3396 y T47-D por la combinación AR/poly(I:C), sugiriendo que otros mecanismos podrían estar implicados en la resistencia a la apoptosis inducida por la combinación AR/poly(I:C).

Además del receptor TLR3, que puede estar localizado en la membrana plasmática (Matsumoto *et al.*, 2002) o en los endosomas (Matsumoto *et al.*, 2003), el poly(I:C) es reconocido por los “sensores” citosólicos MDA-5, RIG-1 y PKR en las células tumorales (Diebold *et al.*, 2003). Además de TLR3, nuestro estudio confirma la regulación de RIG-1 por el AR en las células de cáncer de mama analizadas, tal y como estudios previos han demostrado en otros sistemas celulares (Shyu *et al.*, 2005), sin embargo el AR no modifica los niveles de ARNm de MDA-5 y PKR. Por su parte, el poly(I:C) induce la expresión de los “sensores” analizados en distinta magnitud dependiendo del contexto celular. Nuestros resultados sugieren que la combinación AR/poly(I:C) induce de modo sinérgico la expresión de los “sensores” TLR3, MDA-5, RIG-1 y PKR, amplificando de este modo su señalización celular. El aumento en los niveles de expresión de TLR3, MDA-5 y RIG-1 aumentaría la susceptibilidad de las células de cáncer de mama a los efectos inducidos por el poly(I:C) como ocurre en otros sistemas celulares, donde la sobreexpresión ectópica de, por ejemplo, TLR3 potencia la sensibilidad de las células de neuroblastoma que expresan bajos niveles de TLR3 a poly(I:C) (Chuang *et al.*, 2011). Existen, por otro lado, evidencias que indican que la sobreexpresión de RIG-1 inhibe la proliferación de las células HeLa y 293 (DiSepio *et al.*, 1998; Shyu *et al.*, 2002) y suprime la capacidad de formar colonias de las células de cáncer de mama T47-D y de la línea de queratinocitos HaCaT (Deucher *et al.*, 2000; DiSepio *et al.*, 1998). Estudios adicionales en los que se sobreexpresen de manera ectópica los distintos receptores de *dsRNA* en las células SK-BR-3 desvelarían la importancia de los niveles de expresión de estas proteínas en los efectos antiproliferativos y proapoptóticos de la combinación AR/poly(I:C). Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que el AR solo o en combinación con poly(I:C) es capaz de modular la expresión de diferentes componentes del sistema inmune innato llevando a las células de cáncer de mama a detectar y responder a moléculas que mimetizan *dsRNA* viral, como poly(I:C). Dado que la depleción de TLR3 inhibe completamente la apoptosis inducida por la combinación AR/poly(I:C) en las células SK-BR-3, es poco probable que RIG-1 u otros “sensores” de *dsRNA* puedan jugar un papel importante en la apoptosis inducida por el AR/poly(I:C), aunque no podemos descartar que estos “sensores” citosólicos estén implicados en otros de los efectos inducidos por el AR/poly(I:C), como por ejemplo la inhibición de la proliferación. Serán necesarios más estudios para conocer con detalle la contribución de estos “sensores” en la señalización por AR/poly(I:C) en este contexto celular. En este sentido, si consideramos la inducción de la expresión de TLR3 crucial en la apoptosis inducida por el AR/poly(I:C), podemos especular que cualquier evento que resulte en defectos en la regulación de la expresión de TLR3 en determinados contextos tumorales, podría ser responsable de la resistencia a la apoptosis mediada por el AR/poly(I:C) (por ejemplo, el silenciamiento del promotor de TLR3).

En nuestro estudio, otro evento molecular que desencadena el tratamiento con la combinación AR/poly(I:C) en las células de cáncer de mama SK-BR-3 es la activación de la caspasa-3 y la caspasa-8. Acorde con la literatura, la activación de la vía de señalización apoptótica de TLR3 en respuesta a *dsRNA* puede inducir directamente la activación de la caspasa-8, sin necesidad de activar otras vías de señalización secundarias que desemboquen en la activación de la caspasa-8 (Vercammen *et al.*, 2008a). En este estudio, aunque los resultados muestran que la activación de la caspasa-3 y la caspasa-8 depende de TLR3, ya que la depleción de TLR3 con un ARN interferente específico elimina completamente la activación de ambas caspasas, no podemos descartar que la activación de la caspasa-8 y la caspasa-3 ocurra además mediante un mecanismo indirecto en el que participen los receptores de muerte inducidos por la propia señalización procedente de TLR3.

4. Participación de los IFNs de tipo I en la apoptosis inducida por el AR y el poly(I:C)

La unión del poly(I:C) a TLR3 induce diversas cascadas de señalización que resultan en la activación de efectores moleculares como NF- κ B, p38, JNK y factores reguladores de IFN (IRFs) que inducen la producción de IFN β y de diversas citoquinas y quimioquinas (Takeda and Akira, 2004). En nuestro estudio, el tratamiento de las células de cáncer de mama SK-BR-3 con la combinación AR/poly(I:C) provoca la producción de una serie de quimioquinas como ccl-5, cxcl-10 o IL-8 que potencialmente podrían estar modulando los efectos antiproliferativos y pro-apoptóticos inducidos por esta combinación de agentes. La secreción de quimioquinas CC es determinante para la atracción de los macrófagos, neutrófilos y linfocitos hacia los tumores como se ha demostrado en la carcinogénesis humana (Balkwill and Mantovani, 2001), sin embargo no podemos descartar que además tengan un potencial papel autocrino en las propias células tumorales modulando los efectos pro-apoptogénicos del AR/poly(I:C) en las células SK-BR-3. En el futuro, la manipulación de estas quimioquinas o sus receptores nos servirá para estudiar su impacto en los efectos antiproliferativos y pro-apoptogénicos de la combinación del AR/poly(I:C). Además, el tratamiento con el AR/poly(I:C) en las células SK-BR-3 resulta en la activación de IRF3, el cual se ha demostrado que controla la actividad del promotor de IFN β (Grandvaux *et al.*, 2002), y en la expresión de IFN β . Estos resultados coinciden con los publicados por Francis y Lehman, que muestran que la línea celular murina de carcinoma embrionario F9 diferenciada *in vitro* con AR produce la proteína biológicamente activa IFN β , así como su ARNm en respuesta al poly(I:C) (Francis and Lehman, 1989), probablemente el AR a través de la inducción de los niveles de TLR3 en la superficie celular pueda potenciar la activación de IRF3 por el poly(I:C) y esto, a su vez, explicaría el aumento de la expresión génica del IFN β en estas células y en las células SK-BR-3, aunque no se puede descartar que el AR y el poly(I:C) estén interaccionando a otro nivel en sus respectivas cascadas de señalización. TLR3, RIG-1, MDA-5 y otros genes que amplifican la respuesta a *dsRNA* son clásicos genes diana del IFN (ISGs), así los resultados de este estudio demuestran que el AR coopera con el poly(I:C) para conducir a las células de cáncer de mama a expresar tanto IFN β como genes diana del IFN que a su vez amplificarán o potenciarán la respuesta celular al poly(I:C). Por otro lado, la eficacia del IFN, entre otros, depende del nivel de sus receptores en la superficie celular. En este sentido, se ha descrito que el AR induce la expresión de los receptores para los IFNs de tipo I, lo cual se asocia a un aumento en la señalización por el IFN α/β (Hamamoto *et al.*, 2003; Obora *et al.*, 2002). Además, STAT1 e IRF1, dos moléculas efectoras en la cascada de señalización de los IFNR tipo I son inducidas por el AR en varios modelos celulares de diferente origen incluidas las células de cáncer de mama, lo que indica que el AR puede influir en varios componentes de la cascada de señalización de los IFNs de tipo I. En base a todos estos trabajos podríamos especular que en las células de cáncer de mama, el AR es capaz de aumentar la señalización del poly(I:C), probablemente aumentando la señalización de los IFNs tipo I. Dado que nuestros resultados demuestran que la señalización por los IFNs de tipo I es requerida para la muerte celular inducida por la combinación AR/poly(I:C), podemos sugerir que la apoptosis inducida por el AR/poly(I:C) en las células SK-BR-3 resulta en gran medida de la secreción de IFNs tipo I y consecuentemente de la señalización de los IFNs de tipo I. Sin embargo, los resultados de este estudio demuestran que el IFN β , *per se*, o en combinación con el AR no reproduce la actividad pro-apoptogénica del AR/poly(I:C) en las células de cáncer de mama, demostrando que una señalización adicional procedente del poly(I:C) es necesaria para inducir el programa apoptótico. La implicación de los IFNs tipo I en la muerte inducida por AR/poly(I:C) recuerda a la toxicidad que produce la combinación de *dsRNA* y los IFNs tipo I en algunos contextos celulares (Rasschaert *et al.*, 2005; Salaun *et al.*, 2007a). En la literatura se ha demostrado que

los IFNs de tipo I sensibilizan o inducen la muerte en diversos tipos celulares, induciendo la expresión de otras proteínas que están directamente implicadas en la muerte celular, como las caspasas, TRAIL y p53 (Chawla-Sarkar *et al.*, 2002; Juang *et al.*, 2004; Morrison *et al.*, 2005; Takaoka *et al.*, 2003). Además, los interferones inducen la expresión de múltiples genes que amplifican la respuesta del *dsRNA*, incluyendo PKR, 2'-5' OAS, IRF3 y el propio TLR3, que es conocido como un gen diana de los interferones (Kaiser *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2010). Por último, algunos experimentos han demostrado que la combinación del AR y los IFNs resulta en la inhibición de la proliferación en algunas líneas celulares y permite la expresión sinérgica de la expresión de algunos genes diana del IFN. Dilucidar la influencia del AR sobre la señalización de los IFNs de tipo I así como la contribución exacta de los interferones de tipo I en la muerte celular inducida por la combinación AR/poly(I:C) requerirá de más experimentos.

Atendiendo a la necesidad de la señalización por los interferones de tipo I en la apoptosis inducida por AR/poly(I:C), diferencias en la habilidad de producir y/o responder a los interferones de tipo I en respuesta a la combinación AR/poly(I:C) podrían explicar la variabilidad observada en la sensibilidad a la muerte celular inducida por la combinación de estos agentes en los diferentes contextos celulares. Además, la implicación de los IFNs en la apoptosis, podría explicar por qué el AR es capaz de sinergizar con el poly(I:C) y no con el poly(A:U), siendo ambos agonistas del receptor TLR3. En nuestros resultados observamos que el tratamiento con el AR y el poly(I:C) tiene como resultado la muerte celular, algo que no ocurre cuando incubamos las células SK-BR-3 con el AR y poly(A:U), podría ocurrir que el AR no fuera capaz de cooperar con el poly(A:U) para inducir la expresión de IFN β y como consecuencia no tendría lugar la amplificación de la respuesta celular a los *dsRNA*. Esto es consistente con datos de la literatura en los que el poly(A:U) no induce la activación del promotor de IFN β a través de TLR3 (Alexopoulou *et al.*, 2001), y por tanto no presenta la habilidad de inducir la expresión de IFN β (Okahira *et al.*, 2005).

5. Regulación de la expresión de TRAIL por el AR en combinación con el poly(I:C) en las células de cáncer de mama

Aparte de la señalización de los IFN α 1, hemos demostrado que en la señalización apoptótica por la combinación AR/poly(I:C) están implicados otros eventos moleculares que incluyen, la activación de las caspasas y la inducción de la expresión y actividad del ligando de muerte TRAIL. La activación de la caspasa-3 y -8 por la combinación AR/poly(I:C) es dependiente de TLR3, ya que la depleción de TLR3 elimina completamente la activación de las caspasas en las células SK-BR-3. Además, la inducción de la expresión de TRAIL necesita la participación de TLR3 y de IRF3, como demuestran los ensayos en los que ambas proteínas son suprimidas mediante la transfección de *siRNAs* dirigidos contra cada uno de sus respectivos ARNm. En conjunto, nuestros resultados muestran a TRAIL como una diana de TLR3 y a la vez una diana de IRF3, siendo tanto TLR3 como IRF3 componentes críticos de la inducción de la apoptosis por la combinación AR/poly(I:C). Una cuestión importante es el mecanismo por el cual el tratamiento con la combinación AR/poly(I:C) podría controlar la expresión de TRAIL. Los resultados de este estudio demuestran la fosforilación de IRF3 por el tratamiento con la combinación AR/poly(I:C). En base a nuestros datos suponemos que, la fosforilación de IRF3, que se traduce en la activación de este factor de transcripción, resultaría en la translocación de los dímeros de IRF3 al núcleo, donde se unirían a las secuencias ISRE/IRFE del promotor de TRAIL y en consecuencia se regularía la expresión de TRAIL. Acorde a esto, se ha descrito que IRF3 induce la transcripción de TRAIL tras la infección viral y es capaz de unirse al elemento de

respuesta ISRE presente en el promotor de TRAIL (Kirshner *et al.*, 2005). Recientemente se ha descrito que el AR puede inducir la expresión de TRAIL en células de cáncer de mama a través de IRF1 (Clarke *et al.*, 2004b), sin embargo, nuestros experimentos de depleción claramente sugieren que la inducción de TRAIL por la combinación AR/poly(I:C) requiere de la participación de TLR3 e IRF3, por lo que pensamos que la señal procedente del poly(I:C) es crítica en la regulación de la expresión de TRAIL por el AR/poly(I:C), aunque no podemos descartar una potencial influencia del AR sobre la transcripción de TRAIL a través de IRF1 o a través de su influencia sobre la señalización mediada por los IFNs tipo I. En el futuro, estudios adicionales (como por ejemplo, mapeo del promotor, mutagénesis dirigida, ensayos de retardo en gel, la inmunoprecipitación de la cromatina, etc.) dirigidos a la identificación de los factores de transcripción que se unen al promotor de TRAIL tras el tratamiento con AR /poly(I:C) nos ayudarán a aclarar esta cuestión.

6. TRAIL participa en la muerte celular inducida por el AR en combinación con el poly(I:C) en células de cáncer de mama

La expresión de TRAIL tras el cotratamiento con AR y poly(I:C) es alta y sostenida en el tiempo en las células SK-BR-3, como demuestran los experimentos de cinética y además, coincide en el tiempo con la activación de la caspasa-3 y la caspasa-8. Por otro lado, los ensayos de interferencia realizados sugieren que la apoptosis inducida por el AR/poly(I:C) depende de TLR3 y también de IRF3, y que estos, a su vez son críticos en la inducción de TRAIL por la combinación AR/poly(I:C). En conjunto, nuestros resultados sugieren que TRAIL, como diana de TLR3 e IRF3, podría ser uno de los responsables finales en la apoptosis inducida por la combinación AR/poly(I:C). El ligando de muerte TRAIL pertenece a la familia de las citoquinas TNF y señala a través de sus receptores de muerte, algunos de ellos se caracterizan por presentar dominios de muerte citoplasmáticos DED, responsables de la activación del proceso apoptótico tras la unión del ligando TRAIL al receptor (Ashkenazi and Dixit, 1998; MacFarlane *et al.*, 1997; Pan *et al.*, 1997a; Pan *et al.*, 1997b). TRAIL, principalmente a través de su receptor DR5, induce la apoptosis de células transformadas e infectadas por virus (Chaperot *et al.*, 2006). Varios estudios han sugerido que TRAIL puede tener un papel supresor tumoral ya que (i) TRAIL induce apoptosis en las células cancerosas, mientras que las células normales son en gran medida insensibles a la muerte mediada por TRAIL (Ashkenazi and Dixit, 1999; Walczak *et al.*, 1999; Wang and El-Deiry, 2003) y (ii) la vía de señalización de TRAIL está implicada en la vigilancia que el sistema inmune tiene contra el desarrollo de tumores primarios y metastásicos a través de las células *natural killers* (Bos *et al.*, 2009; Cretney *et al.*, 2002; Takeda *et al.*, 2005; Takeda *et al.*, 2001; Takeda *et al.*, 2002; Yagita *et al.*, 2004). Por otro lado, se ha descrito que la inducción de TRAIL mediada por virus y agonistas para los receptores TLR7 y TLR9, capacita a las células dendríticas con la habilidad de matar a las células tumorales sensibles a TRAIL o las células que han sido infectadas por virus (Chaperot *et al.*, 2006). TRAIL, además, es el mediador de la apoptosis de las células epiteliales de pulmón infectadas por el virus sincitial respiratorio (Kotelkin *et al.*, 2003), de fibroblastos infectados por el CMV humano (Sedger *et al.*, 1999) y de hepatocitos infectados por el virus de la hepatitis C (Mundt *et al.*, 2003). Varios trabajos han descrito la regulación de los receptores de muerte DR4 y DR5, después de una infección viral o del tratamiento con IFN α , sensibilizando a las células a la muerte mediada por TRAIL. Recientemente, se ha descrito que TRAIL participa en la apoptosis inducida por poly(I:C) en células endoteliales (Sun *et al.*, 2011). Además, el ligando de muerte TRAIL es el responsable de la muerte de manera paracrina de células de leucemia en respuesta a retinoides (Altucci *et al.*, 2001). Además, se ha descrito anteriormente que el AR induce la

expresión de TRAIL en las células de cáncer de mama (Clarke *et al.*, 2004b). Nuestros experimentos confirman estos datos, y también muestran una fuerte interacción funcional entre el AR y el poly(I:C) para inducir de forma sinérgica TRAIL. Así, TRAIL surge como un posible candidato que media el efecto apoptótico de la combinación AR/poly(I:C) en las células de cáncer de mama. Para estudiar la participación de TRAIL en la muerte por la combinación AR/poly(I:C), realizamos ensayos en los que se suprimió selectivamente la expresión de TRAIL mediante la transfección de *siRNAs* específicos. Curiosamente, estos estudios demostraron que la apoptosis observada en respuesta al tratamiento por el AR/poly(I:C) es parcialmente dependiente de TRAIL, sugiriendo que TRAIL está participando en la apoptosis por AR/poly(I:C) y que además, probablemente otros mediadores proapoptóticos estén contribuyendo en la apoptosis inducida por la combinación AR/poly(I:C). En este sentido, el receptor FAS, otro miembro de la familia de TNF, cuya expresión se induce sinérgicamente por el cotratamiento AR/poly(I:C) en las células SK-BR-3, podría contribuir en la muerte celular observada. Harían falta nuevos ensayos en los que se suprima selectivamente la expresión del receptor FAS para esclarecer su posible implicación en la muerte celular inducida por la combinación AR/poly(I:C).

Uno de los hallazgos más interesantes de este estudio es que la señalización por el AR pueda cooperar con la señalización del poly(I:C) para inducir la muerte en las células de cáncer de mama, superando la resistencia que las células tumorales tienen a cada uno de estos inductores por separado. Como hemos comentado antes, el poly(I:C) y otros *dsRNA*, por ejemplo, el poly(A:U) se han utilizado durante más de cuatro décadas como *dsRNA* sintéticos para estimular al sistema inmunológico contra el cáncer. Poly(A:U) se ha utilizado de forma segura con un éxito moderado para el tratamiento del cáncer de mama o diversos tipos de cáncer gástrico como monoterapia (Jeung *et al.*, 2008; Laplanche *et al.*, 2000), y recientemente se ha demostrado que el poly(I:C) es capaz de inducir la muerte celular en células de cáncer de mama independientemente de sus efectos en el sistema inmune (Salaun *et al.*, 2011). Por otro lado, el AR tiene un éxito clínico impresionante en el tratamiento de ciertos tipos de leucemias (Lengfelder *et al.*, 2005) y ejerce profundos efectos antiproliferativos en un panel de células de cáncer de mama *in vitro* y en modelos de cáncer de mama murinos (Dawson *et al.*, 1995; Hua *et al.*, 2009). Curiosamente, se ha demostrado recientemente que la combinación AR/poly(I:C) estimula la inmunidad humoral y celular, los tratamientos administrados *in vivo* modulan significativamente la producción de anticuerpos, la distribución de células del sistema inmune, la expresión de genes de citoquinas y la proliferación de células T, lo que sugiere posibles efectos beneficiosos en modelos de cáncer y otras enfermedades donde el sistema inmune no funciona correctamente (DeCicco *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2005a; Ma and Ross, 2005). En conjunto, nuestros resultados muestran que el AR y el poly(I:C) inducen a las células de cáncer de mama a expresar genes diana de IFN, potenciando la respuesta celular al poly(I:C) en estas células e induciendo su muerte. Los resultados de este estudio abren una nueva e importante perspectiva para futuras investigaciones que tengan como objetivo el desarrollo de mejores terapias para el cáncer de mama.

1. El 9cRA en combinación con el IFN γ induce la expresión de cIAP2 a nivel de ARNm y de proteína de manera sinérgica en la línea celular de cáncer de mama SK-BR-3, la cual está asociada a una inhibición de la proliferación celular y a una débil inducción de la apoptosis. La depleción de cIAP2 no sensibiliza a estas células a la acción pro-apoptogénica del 9cRA en combinación con el IFN γ .
2. El 9cRA en combinación con el IFN γ activa la transcripción del promotor del gen cIAP2, principalmente, a través de dos elementos de respuesta a NF- κ B en las posiciones -210 y -147 del promotor. Los elementos de respuesta AP-1 en las posiciones -233 y -220 y el sitio IRF-E en la posición -130 contribuyen a la activación global del promotor de cIAP2 por el 9cRA y el IFN γ .
3. El 9cRA solo o en combinación con el IFN γ aumenta los niveles de ARNm y de proteína de TLR3 en diversas líneas celulares de cáncer de mama *in vitro*. La regulación de la expresión de TLR3 por el 9cRA en la línea celular SK-BR-3 es indirecta y depende de la síntesis de *nov*o de los factores de transcripción que median su acción.
4. El 9cRA y el poly(I:C) cooperan para inhibir el crecimiento en diversos sistemas celulares de cáncer de mama.
5. El 9cRA y el poly(I:C) inducen la muerte de las células de cáncer de mama de manera dependiente del contexto celular. El pan-agonista de RAR, TTNPB, en combinación con el poly(I:C) inducen la apoptosis en la línea celular SK-BR-3, mientras que el pan-agonista de RXR, LG268, no es capaz de cooperar con el poly(I:C) para inducir la apoptosis en esta línea celular. Otro *dsRNA* como es el poly(A:U) no coopera con el 9cRA para inducir la apoptosis en las células SK-BR-3.
6. El 9cRA y el poly(I:C) cooperan de manera sinérgica para inducir la expresión de los "sensores" celulares del *dsRNA*: el receptor tipo-Toll 3, TLR3, las helicasas citosólicas RIG-1 y MDA-5, y la quinasa PKR en las líneas celulares de cáncer de mama SK-BR-3 y ZR-75-1.
7. La apoptosis inducida por el 9cRA y el poly(I:C) en la línea celular SK-BR-3 se asocia con la activación de los factores de transcripción IRF3 y NF- κ B y con la inducción de la expresión de sus genes diana: IFN β , IL-8, ccl-5 y cxcl-10. Adicionalmente, la apoptosis inducida por el 9cRA y el poly(I:C) en esta línea celular se asocia con la activación de la caspasa-3 y la caspasa-8 y la expresión del ligando de muerte TRAIL, cuya inducción es dependiente de TLR3 y de IRF3.
8. La inducción de la apoptosis por el tratamiento con el 9cRA y el poly(I:C) en la línea celular SK-BR-3 es dependiente del receptor TLR3, del factor de transcripción IRF3 y requiere de la señalización inducida por los interferones de tipo I.

9. La supresión de TRAIL bloquea parcialmente la muerte inducida por el tratamiento con el 9cRA y el poly(I:C) en las células de cáncer de mama SK-BR-3, demostrando que TRAIL está involucrado en la apoptosis inducida por el 9cRA y el poly(I:C) en la línea celular SK-BR-3.
10. La expresión del receptor FAS está inducida por el 9cRA y el poly(I:C), como ocurre en el caso del ligando de muerte TRAIL, sugiriendo su potencial implicación en la muerte celular inducida por el 9cRA y el poly(I:C) en las células SK-BR-3 y reforzando el papel relevante de la vía extrínseca en la apoptosis inducida por el 9cRA y el poly(I:C) en las células SK-BR-3.

- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732-738.
- Altieri, D. C. (2003). Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 3, 46-54.
- Altucci, L., and Gronemeyer, H. (2001). The promise of retinoids to fight against cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 181-193.
- Altucci, L., Rossin, A., Raffelsberger, W., Reitmair, A., Chomienne, C., and Gronemeyer, H. (2001). Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL. *Nat Med* 7, 680-686.
- Andre, F., Massard, C., Assi, H., Besse, B., Sabourin, J., and Zitvogel, L. (2006). Toll like receptor 3 expression and efficacy of adjuvant treatment with polyadenylic-polyuridylic acid in patients with axillary node positive breast cancer: Results from two randomized trials. *Journal of Clinical Oncology, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I Vol 24, N° 18S (June 20 Supplement)*, 10563.
- Andre, F., Zitvogel, L., and Sabourin, J. (2008). Treatment of cancer using TLR3 agonists. US Patent:: 7378249.
- Aranda, A., and Pascual, A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81, 1269-1304.
- Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2, 420-430.
- Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.
- Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. (1999). Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 11, 255-260.
- Ashkenazi, A., Pai, R. C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D. A., Marsters, S. A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A. E., Hebert, A., *et al.* (1999). Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 104, 155-162.
- Au, W. Y., Chim, C. S., Lie, A. K., Liang, R., and Kwong, Y. L. (2002). Combined arsenic trioxide and all-trans retinoic acid treatment for acute promyelocytic leukaemia recurring from previous relapses successfully treated using arsenic trioxide. *Br J Haematol* 117, 130-132.
- Balkwill, F., and Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357, 539-545.
- Baretino, D., Vivanco Ruiz, M. M., and Stunnenberg, H. G. (1994). Characterization of the ligand-dependent transactivation domain of thyroid hormone receptor. *EMBO J* 13, 3039-3049.
- Barnard, J. H., Collings, J. C., Whiting, A., Przyborski, S. A., and Marder, T. B. (2009). Synthetic Retinoids: Structure–Activity Relationships. *Chemistry – A European Journal* 15, 11430-11442.
- Bartsch, D., Boye, B., Baust, C., zur Hausen, H., and Schwarz, E. (1992). Retinoic acid-mediated repression of human papillomavirus 18 transcription and different ligand regulation of the retinoic acid receptor beta gene in non-tumorigenic and tumorigenic HeLa hybrid cells. *EMBO J* 11, 2283-2291.
- Bastien, J., Adam-Stitah, S., Riedl, T., Egly, J. M., Chambon, P., and Rochette-Egly, C. (2000). TFIIH interacts with the retinoic acid receptor gamma and phosphorylates its AF-1-activating domain through cdk7. *J Biol Chem* 275, 21896-21904.
- Bastien, J., and Rochette-Egly, C. (2004). Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 328, 1-16.
- Baumann, L., Vujevich, J., Halem, M., Martin, L. K., Kerdell, F., Lazarus, M., Pacheco, H., Black, L., and Bryde, J. (2005). Open-label pilot study of alitretinoin gel 0.1% in the treatment of photoaging. *Cutis* 76, 69-73.

- Belardelli, F., and Ferrantini, M. (2002). Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity. *Trends Immunol* 23, 201-208.
- Bell, J. K., Mullen, G. E., Leifer, C. A., Mazzoni, A., Davies, D. R., and Segal, D. M. (2003). Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol* 24, 528-533.
- Benthin, M., Dallmann, I., and Atzpodien, J. (2001). 13cis- and all-trans retinoic acid have antiproliferative effects on CML cells and render IFN alpha antiproliferative potency after combined treatment in vitro. *Cancer Biother Radiopharm* 16, 323-331.
- Bertrand, M. J., Milutinovic, S., Dickson, K. M., Ho, W. C., Boudreault, A., Durkin, J., Gillard, J. W., Jaquith, J. B., Morris, S. J., and Barker, P. A. (2008). cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol Cell* 30, 689-700.
- Bianchi, K., and Meier, P. (2009). A tangled web of ubiquitin chains: breaking news in TNF-R1 signaling. *Mol Cell* 36, 736-742.
- Bischoff, E. D., Gottardis, M. M., Moon, T. E., Heyman, R. A., and Lamph, W. W. (1998). Beyond tamoxifen: the retinoid X receptor-selective ligand LGD1069 (TARGRETIN) causes complete regression of mammary carcinoma. *Cancer Res* 58, 479-484.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., and Howard, J. C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 15, 749-795.
- Boisnic, S., Branchet, M. C., Pascal, F., Ben Slama, L., Rostin, M., and Szpirglas, H. (1994). [Topical tretinoin in the treatment of lichen planus and leukoplakia of the mouth mucosa. A clinical evaluation]. *Ann Dermatol Venerol* 121, 459-463.
- Bollag, W. (1972). Prophylaxis of chemically induced benign and malignant epithelial tumors by vitamin A acid (retinoic acid). *Eur J Cancer* 8, 689-693.
- Bonanni, B., Lazzeroni, M., and Veronesi, U. (2007). Synthetic retinoid fenretinide in breast cancer chemoprevention. *Expert Rev Anticancer Ther* 7, 423-432.
- Bos, W. H., Bartelds, G. M., Vis, M., van der Horst, A. R., Wolbink, G. J., van de Stadt, R. J., van Schaardenburg, D., Dijkmans, B. A., Lems, W. F., Nurmohamed, M. T., *et al.* (2009). Preferential decrease in IgG4 anti-citrullinated protein antibodies during treatment with tumour necrosis factor blocking agents in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 68, 558-563.
- Bruel, A., Benoit, G., De Nay, D., Brown, S., and Lanotte, M. (1995). Distinct apoptotic responses in maturation sensitive and resistant t(15;17) acute promyelocytic leukemia NB4 cells. 9-cis retinoic acid induces apoptosis independent of maturation and Bcl-2 expression. *Leukemia* 9, 1173-1184.
- Bushue, N., and Wan, Y.-J. Y. (2010). Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62, 1285-1298.
- Careccia, S., Mainardi, S., Pelosi, A., Gurtner, A., Diverio, D., Riccioni, R., Testa, U., Pelosi, E., Piaggio, G., Sacchi, A., *et al.* (2009). A restricted signature of miRNAs distinguishes APL blasts from normal promyelocytes. *Oncogene* 28, 4034-4040.
- Clarke, N., Germain, P., Altucci, L., and Gronemeyer, H. (2004a). Retinoids: potential in cancer prevention and therapy. *Expert Rev Mol Med* 6, 1-23.
- Clarke, N., Jimenez-Lara, A. M., Voltz, E., and Gronemeyer, H. (2004b). Tumor suppressor IRF-1 mediates retinoid and interferon anticancer signaling to death ligand TRAIL. *EMBO J* 23, 3051-3060.

- Cory, S., and Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 647-656.
- Cretney, E., Takeda, K., Yagita, H., Glaccum, M., Peschon, J. J., and Smyth, M. J. (2002). Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J Immunol* 168, 1356-1361.
- Cummins, J. M., Kohli, M., Rago, C., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Bunz, F. (2004). X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is a nonredundant modulator of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis in human cancer cells. *Cancer Res* 64, 3006-3008.
- Chambon, P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 10, 940-954.
- Chaperot, L., Blum, A., Manches, O., Lui, G., Angel, J., Molens, J. P., and Plumas, J. (2006). Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 176, 248-255.
- Chawla-Sarkar, M., Leaman, D. W., Jacobs, B. S., and Borden, E. C. (2002). IFN-beta pretreatment sensitizes human melanoma cells to TRAIL/Apo2 ligand-induced apoptosis. *J Immunol* 169, 847-855.
- Chen, H., Zhang, H., Lee, J., Liang, X., Wu, X., Zhu, T., Lo, P. K., Zhang, X., and Sukumar, S. (2007). HOXA5 acts directly downstream of retinoic acid receptor beta and contributes to retinoic acid-induced apoptosis and growth inhibition. *Cancer Res* 67, 8007-8013.
- Chen, Y., Dokmanovic, M., Stein, W. D., Ardecky, R. J., and Roninson, I. B. (2006). Agonist and antagonist of retinoic acid receptors cause similar changes in gene expression and induce senescence-like growth arrest in MCF-7 breast carcinoma cells. *Cancer Res* 66, 8749-8761.
- Chomienne, C., Balitrand, N., Cost, H., Degos, L., and Abita, J. P. (1986). Structure-activity relationships of aromatic retinoids on the differentiation of the human histiocytic lymphoma cell line U-937. *Leuk Res* 10, 1301-1305.
- Chomienne, C., Fenaux, P., and Degos, L. (1996). Retinoid differentiation therapy in promyelocytic leukemia. *FASEB J* 10, 1025-1030.
- Chuang, J. H., Chuang, H. C., Huang, C. C., Wu, C. L., Du, Y. Y., Kung, M. L., Chen, C. H., Chen, S. C., and Tai, M. H. (2011). Differential toll-like receptor 3 (TLR3) expression and apoptotic response to TLR3 agonist in human neuroblastoma cells. *J Biomed Sci* 18, 65.
- Dawson, M. I., Chao, W. R., Pine, P., Jong, L., Hobbs, P. D., Rudd, C. K., Quick, T. C., Niles, R. M., Zhang, X. K., Lombardo, A., and et al. (1995). Correlation of retinoid binding affinity to retinoic acid receptor alpha with retinoid inhibition of growth of estrogen receptor-positive MCF-7 mammary carcinoma cells. *Cancer Res* 55, 4446-4451.
- de Lera, A. R., Bourguet, W., Altucci, L., and Gronemeyer, H. (2007). Design of selective nuclear receptor modulators: RAR and RXR as a case study. *Nat Rev Drug Discov* 6, 811-820.
- de The, H., Chomienne, C., Lanotte, M., Degos, L., and Dejean, A. (1990). The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature* 347, 558-561.
- de The, H., Lavau, C., Marchio, A., Chomienne, C., Degos, L., and Dejean, A. (1991). The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* 66, 675-684.
- de Urquiza, A. M., Liu, S., Sjoberg, M., Zetterstrom, R. H., Griffiths, W., Sjovall, J., and Perlmann, T. (2000). Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science* 290, 2140-2144.
- Deb, A., Haque, S. J., Mogensen, T., Silverman, R. H., and Williams, B. R. (2001). RNA-dependent protein kinase PKR is required for activation of NF-kappa B by IFN-gamma in a STAT1-independent pathway. *J Immunol* 166, 6170-6180.

- DeCicco, K. L., Youngdahl, J. D., and Ross, A. C. (2001). All-trans-retinoic acid and polyribonucleosinic : polyribocytidylic acid in combination potentiate specific antibody production and cell-mediated immunity. *Immunology* 104, 341-348.
- Deucher, A., Nagpal, S., Chandraratna, R. A., Di Sepio, D., Robinson, N. A., Dashti, S. R., and Eckert, R. L. (2000). The carboxy-terminal hydrophobic domain of TIG3, a class II tumor suppressor protein, is required for appropriate cellular localization and optimal biological activity. *Int J Oncol* 17, 1195-1203.
- Diebold, S. S., Montoya, M., Unger, H., Alexopoulou, L., Roy, P., Haswell, L. E., Al-Shamkhani, A., Flavell, R., Borrow, P., and Reis e Sousa, C. (2003). Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. *Nature* 424, 324-328.
- Dilworth, F. J., and Chambon, P. (2001). Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription. *Oncogene* 20, 3047-3054.
- Dimberg, A., Nilsson, K., and Oberg, F. (2000). Phosphorylation-deficient Stat1 inhibits retinoic acid-induced differentiation and cell cycle arrest in U-937 monoblasts. *Blood* 96, 2870-2878.
- DiSepio, D., Ghosn, C., Eckert, R. L., Deucher, A., Robinson, N., Duvic, M., Chandraratna, R. A., and Nagpal, S. (1998). Identification and characterization of a retinoid-induced class II tumor suppressor/growth regulatory gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14811-14815.
- Dogusan, Z., Garcia, M., Flamez, D., Alexopoulou, L., Goldman, M., Gysemans, C., Mathieu, C., Libert, C., Eizirik, D. L., and Rasschaert, J. (2008). Double-stranded RNA induces pancreatic beta-cell apoptosis by activation of the toll-like receptor 3 and interferon regulatory factor 3 pathways. *Diabetes* 57, 1236-1245.
- Dolle, P. (2009). Developmental expression of retinoic acid receptors (RARs). *Nucl Recept Signal* 7, e006.
- Donato, L. J., Suh, J. H., and Noy, N. (2007). Suppression of mammary carcinoma cell growth by retinoic acid: the cell cycle control gene Btg2 is a direct target for retinoic acid receptor signaling. *Cancer Res* 67, 609-615.
- Durand, B., Saunders, M., Gaudon, C., Roy, B., Losson, R., and Chambon, P. (1994). Activation function 2 (AF-2) of retinoic acid receptor and 9-cis retinoic acid receptor: presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of the nature of the response element on AF-2 activity. *EMBO J* 13, 5370-5382.
- Duvic, M., Friedman-Kien, A. E., Looney, D. J., Miles, S. A., Myskowski, P. L., Scadden, D. T., Von Roenn, J., Galpin, J. E., Groopman, J., Loewen, G., *et al.* (2000). Topical treatment of cutaneous lesions of acquired immunodeficiency syndrome-related Kaposi sarcoma using alitretinoin gel: results of phase 1 and 2 trials. *Arch Dermatol* 136, 1461-1469.
- Easwaran, V., Pishvaian, M., Salimuddin, and Byers, S. (1999). Cross-regulation of beta-catenin-LEF/TCF and retinoid signaling pathways. *Curr Biol* 9, 1415-1418.
- Esteller, M., Fraga, M. F., Paz, M. F., Campo, E., Colomer, D., Novo, F. J., Calasanz, M. J., Galm, O., Guo, M., Benitez, J., and Herman, J. G. (2002). Cancer epigenetics and methylation. *Science* 297, 1807-1808; discussion 1807-1808.
- Fanjul, A. N., Bouterfa, H., Dawson, M., and Pfahl, M. (1996). Potential role for retinoic acid receptor-gamma in the inhibition of breast cancer cells by selective retinoids and interferons. *Cancer Res* 56, 1571-1577.
- Faria, T. N., Mendelsohn, C., Chambon, P., and Gudas, L. J. (1999). The targeted disruption of both alleles of RARbeta(2) in F9 cells results in the loss of retinoic acid-associated growth arrest. *J Biol Chem* 274, 26783-26788.
- Farias, E. F., Arapshian, A., Bleiweiss, I. J., Waxman, S., Zelent, A., and Mira, Y. L. R. (2002). Retinoic acid receptor alpha2 is a growth suppressor epigenetically silenced in MCF-7 human breast cancer cells. *Cell Growth Differ* 13, 335-341.
- Feng, Z., and Porter, A. G. (1999). NF-kappaB/Rel proteins are required for neuronal differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 274, 30341-30344.

- Feoktistova, M., Geserick, P., Kellert, B., Dimitrova, D. P., Langlais, C., Hupe, M., Cain, K., MacFarlane, M., Hacker, G., and Leverkus, M. (2011). cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms. *Mol Cell* 43, 449-463.
- Fisher, G. J., Datta, S. C., Talwar, H. S., Wang, Z. Q., Varani, J., Kang, S., and Voorhees, J. J. (1996). Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature* 379, 335-339.
- Foster, F. M., Owens, T. W., Tanianis-Hughes, J., Clarke, R. B., Brennan, K., Bundred, N. J., and Streuli, C. H. (2009). Targeting inhibitor of apoptosis proteins in combination with ErbB antagonists in breast cancer. *Breast Cancer Res* 11, R41.
- Fraker, L. D., Halter, S. A., and Forbes, J. T. (1984). Growth inhibition by retinol of a human breast carcinoma cell line in vitro and in athymic mice. *Cancer Res* 44, 5757-5763.
- Francis, M. K., and Lehman, J. M. (1989). Control of beta-interferon expression in murine embryonal carcinoma F9 cells. *Mol Cell Biol* 9, 3553-3556.
- Friboulet, L., Gourzones, C., Tsao, S. W., Morel, Y., Paturel, C., Temam, S., Uzan, C., and Busson, P. (2010). Poly(I:C) induces intense expression of c-IAP2 and cooperates with an IAP inhibitor in induction of apoptosis in cancer cells. *BMC Cancer* 10, 327.
- Friedman, C. S., O'Donnell, M. A., Legarda-Addison, D., Ng, A., Cardenas, W. B., Yount, J. S., Moran, T. M., Basler, C. F., Komuro, A., Horvath, C. M., *et al.* (2008). The tumour suppressor CYLD is a negative regulator of RIG-I-mediated antiviral response. *EMBO Rep* 9, 930-936.
- Fu, M., Wang, C., Zhang, X., and Pestell, R. G. (2004). Acetylation of nuclear receptors in cellular growth and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 68, 1199-1208.
- Gaither, A., Porter, D., Yao, Y., Borawski, J., Yang, G., Donovan, J., Sage, D., Slisz, J., Tran, M., Straub, C., *et al.* (2007). A Smac mimetic rescue screen reveals roles for inhibitor of apoptosis proteins in tumor necrosis factor-alpha signaling. *Cancer Res* 67, 11493-11498.
- Gianni, M., Terao, M., Fortino, I., LiCalzi, M., Viggiano, V., Barbui, T., Rambaldi, A., and Garattini, E. (1997). Stat1 is induced and activated by all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* 89, 1001-1012.
- Giguere, V., Ong, E. S., Segui, P., and Evans, R. M. (1987). Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 330, 624-629.
- Gitlin, L., Barchet, W., Gilfillan, S., Cella, M., Beutler, B., Flavell, R. A., Diamond, M. S., and Colonna, M. (2006). Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8459-8464.
- Goodman, D. S. (1984). Vitamin A and retinoids in health and disease. *N Engl J Med* 310, 1023-1031.
- Grandvaux, N., Servant, M. J., tenOever, B., Sen, G. C., Balachandran, S., Barber, G. N., Lin, R., and Hiscott, J. (2002). Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes. *J Virol* 76, 5532-5539.
- Gronemeyer, H., Gustafsson, J.-A., and Laudet, V. (2004). Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* 3, 950-964.
- Guo, F., Sigua, C., Tao, J., Bali, P., George, P., Li, Y., Wittmann, S., Moscinski, L., Atadja, P., and Bhalla, K. (2004). Cotreatment with histone deacetylase inhibitor LAQ824 enhances Apo-2L/tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-induced death inducing signaling complex activity and apoptosis of human acute leukemia cells. *Cancer Res* 64, 2580-2589.

- Gyrd-Hansen, M., and Meier, P. (2010). IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer* 10, 561-574.
- Haas, T. L., Emmerich, C. H., Gerlach, B., Schmukle, A. C., Cordier, S. M., Rieser, E., Feltham, R., Vince, J., Warnken, U., Wenger, T., *et al.* (2009). Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction. *Mol Cell* 36, 831-844.
- Hafezi-Moghadam, A., Simoncini, T., Yang, Z., Limbourg, F. P., Plumier, J. C., Rebsamen, M. C., Hsieh, C. M., Chui, D. S., Thomas, K. L., Prorock, A. J., *et al.* (2002). Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med* 8, 473-479.
- Hamada, K., Gleason, S. L., Levi, B. Z., Hirschfeld, S., Appella, E., and Ozato, K. (1989). H-2RIIBP, a member of the nuclear hormone receptor superfamily that binds to both the regulatory element of major histocompatibility class I genes and the estrogen response element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 8289-8293.
- Hamamoto, S., Fukuda, R., Ishimura, N., Rumi, M. A., Kazumori, H., Uchida, Y., Kadowaki, Y., Ishihara, S., and Kinoshita, Y. (2003). 9-cis retinoic acid enhances the antiviral effect of interferon on hepatitis C virus replication through increased expression of type I interferon receptor. *J Lab Clin Med* 141, 58-66.
- Harisiadis, L., Miller, R. C., Hall, E. J., and Borek, C. (1978). A vitamin A analogue inhibits radiation-induced oncogenic transformation. *Nature* 274, 486-487.
- Heinz, S., Haehnel, V., Karaghiosoff, M., Schwarzfischer, L., Muller, M., Krause, S. W., and Rehli, M. (2003). Species-specific regulation of Toll-like receptor 3 genes in men and mice. *J Biol Chem* 278, 21502-21509.
- Herold, C., Ganslmayer, M., Ocker, M., Hermann, M., Hahn, E. G., and Schuppan, D. (2002). Combined in vitro anti-tumoral action of tamoxifen and retinoic acid derivatives in hepatoma cells. *Int J Oncol* 20, 89-96.
- Hoffmann, B., Lehmann, J. M., Zhang, X. K., Hermann, T., Husmann, M., Graupner, G., and Pfahl, M. (1990). A retinoic acid receptor-specific element controls the retinoic acid receptor-beta promoter. *Mol Endocrinol* 4, 1727-1736.
- Hong, S. Y., Yoon, W. H., Park, J. H., Kang, S. G., Ahn, J. H., and Lee, T. H. (2000). Involvement of two NF-kappa B binding elements in tumor necrosis factor alpha -, CD40-, and epstein-barr virus latent membrane protein 1-mediated induction of the cellular inhibitor of apoptosis protein 2 gene. *J Biol Chem* 275, 18022-18028.
- Hong, W. K., and Sporn, M. B. (1997). Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science* 278, 1073-1077.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K. K., Schlee, M., *et al.* (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314, 994-997.
- Hougardy, B. M., Maduro, J. H., van der Zee, A. G., de Groot, D. J., van den Heuvel, F. A., de Vries, E. G., and de Jong, S. (2006). Proteasome inhibitor MG132 sensitizes HPV-positive human cervical cancer cells to rhTRAIL-induced apoptosis. *Int J Cancer* 118, 1892-1900.
- Houle, B., Rochette-Egly, C., and Bradley, W. E. (1993). Tumor-suppressive effect of the retinoic acid receptor beta in human epidermoid lung cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 985-989.
- Hu, L., Crowe, D. L., Rheinwald, J. G., Chambon, P., and Gudas, L. J. (1991). Abnormal expression of retinoic acid receptors and keratin 19 by human oral and epidermal squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Res* 51, 3972-3981.
- Hua, S., Kittler, R., and White, K. P. (2009). Genomic antagonism between retinoic acid and estrogen signaling in breast cancer. *Cell* 137, 1259-1271.
- Huang, M. E., Ye, Y. C., Chen, S. R., Chai, J. R., Lu, J. X., Zhao, L., Gu, L. J., and Wang, Z. Y. (1988). Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 72, 567-572.

- Hunter, A. M., LaCasse, E. C., and Korneluk, R. G. (2007). The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis* 12, 1543-1568.
- Hunter, K., Maden, M., Summerbell, D., Eriksson, U., and Holder, N. (1991). Retinoic acid stimulates neurite outgrowth in the amphibian spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3666-3670.
- Hymowitz, S. G., O'Connell, M. P., Ultsch, M. H., Hurst, A., Totpal, K., Ashkenazi, A., de Vos, A. M., and Kelley, R. F. (2000). A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL. *Biochemistry* 39, 633-640.
- Ikeda, H., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2002). The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev* 13, 95-109.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., *et al.* (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190-195.
- Isaacs, A., and Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147, 258-267.
- Isaacs, A., Lindenmann, J., and Valentine, R. C. (1957). Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147, 268-273.
- Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5, 987-995.
- Jasani, B., Navabi, H., and Adams, M. (2009). Ampligen: a potential toll-like 3 receptor adjuvant for immunotherapy of cancer. *Vaccine* 27, 3401-3404.
- Jeung, H. C., Moon, Y. W., Rha, S. Y., Yoo, N. C., Roh, J. K., Noh, S. H., Min, J. S., Kim, B. S., and Chung, H. C. (2008). Phase III trial of adjuvant 5-fluorouracil and adriamycin versus 5-fluorouracil, adriamycin, and polyadenylic-polyuridylic acid (poly A:U) for locally advanced gastric cancer after curative surgery: final results of 15-year follow-up. *Ann Oncol* 19, 520-526.
- Jiang, Q., Wei, H., and Tian, Z. (2008). Poly I:C enhances cycloheximide-induced apoptosis of tumor cells through TLR3 pathway. *BMC Cancer* 8, 12.
- Jiang, X., and Wang, X. (2000). Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem* 275, 31199-31203.
- Jimenez-Lara, A. M., Aranda, A., and Gronemeyer, H. (2010). Retinoic acid protects human breast cancer cells against etoposide-induced apoptosis by NF-kappaB-dependent but cIAP2-independent mechanisms. *Mol Cancer* 9, 15.
- Juang, S. H., Wei, S. J., Hung, Y. M., Hsu, C. Y., Yang, D. M., Liu, K. J., Chen, W. S., and Yang, W. K. (2004). IFN-beta induces caspase-mediated apoptosis by disrupting mitochondria in human advanced stage colon cancer cell lines. *J Interferon Cytokine Res* 24, 231-243.
- Kaiser, W. J., Kaufman, J. L., and Offermann, M. K. (2004). IFN-alpha sensitizes human umbilical vein endothelial cells to apoptosis induced by double-stranded RNA. *J Immunol* 172, 1699-1710.
- Kaiser, W. J., and Offermann, M. K. (2005). Apoptosis induced by the toll-like receptor adaptor TRIF is dependent on its receptor interacting protein homotypic interaction motif. *J Immunol* 174, 4942-4952.
- Kang, J., Kisenge, R. R., Toyoda, H., Tanaka, S., Bu, J., Azuma, E., and Komada, Y. (2003). Chemical sensitization and regulation of TRAIL-induced apoptosis in a panel of B-lymphocytic leukaemia cell lines. *Br J Haematol* 123, 921-932.
- Kanzler, H., Barrat, F. J., Hessel, E. M., and Coffman, R. L. (2007). Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med* 13, 552-559.

- Karikari, C. A., Roy, I., Tryggestad, E., Feldmann, G., Pinilla, C., Welsh, K., Reed, J. C., Armour, E. P., Wong, J., Herman, J., *et al.* (2007). Targeting the apoptotic machinery in pancreatic cancers using small-molecule antagonists of the X-linked inhibitor of apoptosis protein. *Mol Cancer Ther* 6, 957-966.
- Kastner, P., Mark, M., and Chambon, P. (1995). Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* 83, 859-869.
- Kastner, P., Mark, M., Leid, M., Gansmuller, A., Chin, W., Grondona, J. M., Decimo, D., Krezel, W., Dierich, A., and Chambon, P. (1996). Abnormal spermatogenesis in RXR beta mutant mice. *Genes Dev* 10, 80-92.
- Kawai, T., and Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell Death Differ* 13, 816-825.
- Kawai, T., and Akira, S. (2007). TLR signaling. *Semin Immunol* 19, 24-32.
- Kelly, G. L., and Strasser, A. (2011). The essential role of evasion from cell death in cancer. *Adv Cancer Res* 111, 39-96.
- Kerbaui, D. M., Lesnikov, V., Abbasi, N., Seal, S., Scott, B., and Deeg, H. J. (2005). NF-kappaB and FLIP in arsenic trioxide (ATO)-induced apoptosis in myelodysplastic syndromes (MDSs). *Blood* 106, 3917-3925.
- Kim, K. N., Pie, J. E., Park, J. H., Park, Y. H., Kim, H. W., and Kim, M. K. (2006a). Retinoic acid and ascorbic acid act synergistically in inhibiting human breast cancer cell proliferation. *J Nutr Biochem* 17, 454-462.
- Kim, S. J., Choi, H. J., Jin, U. H., Lee, Y. C., and Kim, C. H. (2006b). Transcriptional regulation of the human Sia-alpha2,3-Gal-beta1,4-GlcNAc-R:alpha2,8-sialyltransferase (hST8Sia III) by retinoic acid in human glioblastoma tumor cell line. *Biochim Biophys Acta* 1759, 451-457.
- Kirshner, J. R., Karpova, A. Y., Kops, M., and Howley, P. M. (2005). Identification of TRAIL as an interferon regulatory factor 3 transcriptional target. *J Virol* 79, 9320-9324.
- Kischkel, F. C., Lawrence, D. A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K. J., and Ashkenazi, A. (2000). Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* 12, 611-620.
- Koshiuka, K., Elstner, E., Williamson, E., Said, J. W., Tada, Y., and Koeffler, H. P. (2000). Novel therapeutic approach: organic arsenical melarsoprol alone or with all-trans-retinoic acid markedly inhibit growth of human breast and prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Br J Cancer* 82, 452-458.
- Kotelkin, A., Prikhod'ko, E. A., Cohen, J. I., Collins, P. L., and Bukreyev, A. (2003). Respiratory syncytial virus infection sensitizes cells to apoptosis mediated by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Virol* 77, 9156-9172.
- Kraemer, K. H., DiGiovanna, J. J., and Peck, G. L. (1992). Chemoprevention of skin cancer in xeroderma pigmentosum. *J Dermatol* 19, 715-718.
- Krieg, A. M. (2008). Toll-like receptor 9 (TLR9) agonists in the treatment of cancer. *Oncogene* 27, 161-167.
- Kupumbati, T. S., Cattoretti, G., Marzan, C., Farias, E. F., Taneja, R., and Mira-y-Lopez, R. (2006). Dominant negative retinoic acid receptor initiates tumor formation in mice. *Mol Cancer* 5, 12.
- LaCasse, E. C., Baird, S., Korneluk, R. G., and MacKenzie, A. E. (1998). The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 17, 3247-3259.
- Lacour, J., Laplanche, A., Delozier, T., Berlie, J., Mourali, N., Julien, J. P., De Gislain, C., Namer, M., Petit, J. C., Denis, V., and *et al.* (1991). Polyadenylic-polyuridylic acid plus locoregional and pelvic radiotherapy versus chemotherapy with CMF as adjuvants in operable breast cancer. A 6 1/2 year follow-up analysis of a randomized trial of the French Federation of Cancer Centers (F.F.C.C.). *Breast Cancer Res Treat* 19, 15-21.
- Lam, P. K., To, E. W., Chan, E. S., Liew, C. T., Lung, I. W., and King, W. K. (2001). In vitro inhibition of head and neck cancer-cell growth by human recombinant interferon-alpha and 13-cis retinoic acid. *Br J Biomed Sci* 58, 226-229.

- Lanska, D. J. (2009). Historical perspective: neurological advances from studies of war injuries and illnesses. *Ann Neurol* 66, 444-459.
- Laplanche, A., Alzieu, L., Delozier, T., Berlie, J., Veyret, C., Fargeot, P., Luboinski, M., and Lacour, J. (2000). Polyadenylic-polyuridylic acid plus locoregional radiotherapy versus chemotherapy with CMF in operable breast cancer: a 14 year follow-up analysis of a randomized trial of the Federation Nationale des Centres de Lutte contre le Cancer (FNCLCC). *Breast Cancer Res Treat* 64, 189-191.
- Lasnitzki, I. (1955). The influence of A hypervitaminosis on the effect of 20-methylcholanthrene on mouse prostate glands grown in vitro. *Br J Cancer* 9, 434-441.
- Laudet, V., and Gronemeyer, H. (2002). *The Nuclear receptor Facts Book* (San Diego, Academic Press)
- Lavrik, I., Golks, A., and Krammer, P. H. (2005). Death receptor signaling. *J Cell Sci* 118, 265-267.
- Leggatt, G. R., Dunn, L. A., De Kluyver, R. L., Stewart, T., and Frazer, I. H. (2002). Interferon-gamma enhances cytotoxic T lymphocyte recognition of endogenous peptide in keratinocytes without lowering the requirement for surface peptide. *Immunol Cell Biol* 80, 415-424.
- Leid, M., Kastner, P., Lyons, R., Nakshatri, H., Saunders, M., Zacharewski, T., Chen, J. Y., Staub, A., Garnier, J. M., Mader, S., and et al. (1992). Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell* 68, 377-395.
- Lemotte, P. K., Keidel, S., and Apfel, C. M. (1996). Phytanic acid is a retinoid X receptor ligand. *Eur J Biochem* 236, 328-333.
- Lengfelder, E., Saussele, S., Weisser, A., Buchner, T., and Hehlmann, R. (2005). Treatment concepts of acute promyelocytic leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 56, 261-274.
- Levin, E. R. (2005). Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol* 19, 1951-1959.
- Li, J., Orr, B., White, K., Belogortseva, N., Niles, R., Boskovic, G., Nguyen, H., Dykes, A., and Park, M. (2009). Chmp 1A is a mediator of the anti-proliferative effects of all-trans retinoic acid in human pancreatic cancer cells. *Mol Cancer* 8, 7.
- Li, J. J., Dong, Z., Dawson, M. I., and Colburn, N. H. (1996). Inhibition of tumor promoter-induced transformation by retinoids that transrepress AP-1 without transactivating retinoic acid response element. *Cancer Res* 56, 483-489.
- Li, R., Faria, T. N., Boehm, M., Nabel, E. G., and Gudas, L. J. (2004). Retinoic acid causes cell growth arrest and an increase in p27 in F9 wild type but not in F9 retinoic acid receptor beta2 knockout cells. *Exp Cell Res* 294, 290-300.
- Lin, X. F., Zhao, B. X., Chen, H. Z., Ye, X. F., Yang, C. Y., Zhou, H. Y., Zhang, M. Q., Lin, S. C., and Wu, Q. (2004). RXRalpha acts as a carrier for TR3 nuclear export in a 9-cis retinoic acid-dependent manner in gastric cancer cells. *J Cell Sci* 117, 5609-5621.
- Lindner, D. J., Borden, E. C., and Kalvakolanu, D. V. (1997). Synergistic antitumor effects of a combination of interferons and retinoic acid on human tumor cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 3, 931-937.
- Lindner, D. J., Ma, X., Hu, J., Karra, S., and Kalvakolanu, D. V. (2002). Thioredoxin reductase plays a critical role in IFN retinoid-mediated tumor-growth control in vivo. *Clin Cancer Res* 8, 3210-3218.
- Lingen, M. W., Polverini, P. J., and Bouck, N. P. (1998). Retinoic acid and interferon alpha act synergistically as antiangiogenic and antitumor agents against human head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 58, 5551-5558.
- Lippman, S. M., Kavanagh, J. J., Paredes-Espinoza, M., Delgadillo-Madrueno, F., Paredes-Casillas, P., Hong, W. K., Holdener, E., and Krakoff, I. H. (1992a). 13-cis-retinoic acid plus interferon alpha-2a: highly active systemic therapy for squamous cell carcinoma of the cervix. *J Natl Cancer Inst* 84, 241-245.

- Lippman, S. M., Lotan, R., and Schleuniger, U. (1997). Retinoid-interferon therapy of solid tumors. *Int J Cancer* 70, 481-483.
- Lippman, S. M., Parkinson, D. R., Itri, L. M., Weber, R. S., Schantz, S. P., Ota, D. M., Schusterman, M. A., Krakoff, I. H., Gutterman, J. U., and Hong, W. K. (1992b). 13-cis-retinoic acid and interferon alpha-2a: effective combination therapy for advanced squamous cell carcinoma of the skin. *J Natl Cancer Inst* 84, 235-241.
- Liston, P., Fong, W. G., Kelly, N. L., Toji, S., Miyazaki, T., Conte, D., Tamai, K., Craig, C. G., McBurney, M. W., and Korneluk, R. G. (2001). Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity. *Nat Cell Biol* 3, 128-133.
- Liu, M., Iavarone, A., and Freedman, L. P. (1996). Transcriptional activation of the human p21(WAF1/CIP1) gene by retinoic acid receptor. Correlation with retinoid induction of U937 cell differentiation. *J Biol Chem* 271, 31723-31728.
- Locksley, R. M., Killeen, N., and Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501.
- Lopez-Carballo, G., Moreno, L., Masia, S., Perez, P., and Barettino, D. (2002). Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 277, 25297-25304.
- Losel, R., and Wehling, M. (2003). Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 46-56.
- Lotan, R., and Lotan, Y. (2004). Retinoic acid receptor beta2 hypermethylation: implications for prostate cancer detection, prevention, and therapy. *Clin Cancer Res* 10, 3935-3936.
- Ludwig, K. W., Lowey, B., and Niles, R. M. (1980). Retinoic acid increases cyclic AMP-dependent protein kinase activity in murine melanoma cells. *J Biol Chem* 255, 5999-6002.
- Lufei, C., Ma, J., Huang, G., Zhang, T., Novotny-Diermayr, V., Ong, C. T., and Cao, X. (2003). GRIM-19, a death-regulatory gene product, suppresses Stat3 activity via functional interaction. *EMBO J* 22, 1325-1335.
- Luisi, B. F., Xu, W. X., Otwinowski, Z., Freedman, L. P., Yamamoto, K. R., and Sigler, P. B. (1991). Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 352, 497-505.
- Luria, A., and Furlow, J. D. (2004). Spatiotemporal retinoid-X receptor activation detected in live vertebrate embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8987-8992.
- Ma, Y., Chen, Q., and Ross, A. C. (2005a). Retinoic acid and polyriboinosinic:polyribocytidylic acid stimulate robust anti-tetanus antibody production while differentially regulating type 1/type 2 cytokines and lymphocyte populations. *J Immunol* 174, 7961-7969.
- Ma, Y., Feng, Q., Sekula, D., Diehl, J. A., Freemantle, S. J., and Dmitrovsky, E. (2005b). Retinoid targeting of different D-type cyclins through distinct chemopreventive mechanisms. *Cancer Res* 65, 6476-6483.
- Ma, Y., and Ross, A. C. (2005). The anti-tetanus immune response of neonatal mice is augmented by retinoic acid combined with polyriboinosinic:polyribocytidylic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13556-13561.
- MacFarlane, M., Ahmad, M., Srinivasula, S. M., Fernandes-Alnemri, T., Cohen, G. M., and Alnemri, E. S. (1997). Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 272, 25417-25420.
- Mader, S., Chen, J. Y., Chen, Z., White, J., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1993). The patterns of binding of RAR, RXR and TR homo- and heterodimers to direct repeats are dictated by the binding specificities of the DNA binding domains. *EMBO J* 12, 5029-5041.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9, 153-166.

- Mangelsdorf, D. J., Borgmeyer, U., Heyman, R. A., Zhou, J. Y., Ong, E. S., Oro, A. E., Kakizuka, A., and Evans, R. M. (1992). Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev* 6, 329-344.
- Mangelsdorf, D. J., and Evans, R. M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841-850.
- Mangelsdorf, D. J., Ong, E. S., Dyck, J. A., and Evans, R. M. (1990). Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 345, 224-229.
- Marth, C., Daxenbichler, G., and Dapunt, O. (1986). Synergistic antiproliferative effect of human recombinant interferons and retinoic acid in cultured breast cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 77, 1197-1202.
- Marth, C., Widschwendter, M., and Daxenbichler, G. (1993). Mechanism of synergistic action of all-trans- or 9-cis-retinoic acid and interferons in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 47, 123-126.
- Marth, C., Zech, J., Bock, G., Mayer, I., and Daxenbichler, G. (1987). Effects of retinoids and interferon-gamma on cultured breast cancer cells in comparison with tumor necrosis factor alpha. *Int J Cancer* 40, 840-845.
- Masia, S., Alvarez, S., de Lera, A. R., and Baretino, D. (2007). Rapid, nongenomic actions of retinoic acid on phosphatidylinositol-3-kinase signaling pathway mediated by the retinoic acid receptor. *Mol Endocrinol* 21, 2391-2402.
- Massad, L. S., Turyk, M. E., Bitterman, P., and Wilbanks, G. D. (1996). Interferon-alpha and all-trans-retinoic acid reversibly inhibit the in vitro proliferation of cell lines derived from cervical cancers. *Gynecol Oncol* 60, 428-434.
- Mathieu, J., Giraudier, S., Lanotte, M., and Besancon, F. (2005). Retinoid-induced activation of NF-kappaB in APL cells is not essential for granulocytic differentiation, but prolongs the life span of mature cells. *Oncogene* 24, 7145-7155.
- Matikainen, S., Ronni, T., Hurme, M., Pine, R., and Julkunen, I. (1996). Retinoic acid activates interferon regulatory factor-1 gene expression in myeloid cells. *Blood* 88, 114-123.
- Matsumoto, M., Funami, K., Tanabe, M., Oshiumi, H., Shingai, M., Seto, Y., Yamamoto, A., and Seya, T. (2003). Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* 171, 3154-3162.
- Matsumoto, M., Kikkawa, S., Kohase, M., Miyake, K., and Seya, T. (2002). Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 1364-1369.
- McManus, D. C., Lefebvre, C. A., Cherton-Horvat, G., St-Jean, M., Kandimalla, E. R., Agrawal, S., Morris, S. J., Durkin, J. P., and Lacasse, E. C. (2004). Loss of XIAP protein expression by RNAi and antisense approaches sensitizes cancer cells to functionally diverse chemotherapeutics. *Oncogene* 23, 8105-8117.
- Meani, N., Minardi, S., Licciulli, S., Gelmetti, V., Coco, F. L., Nervi, C., Pelicci, P. G., Muller, H., and Alcalay, M. (2005). Molecular signature of retinoic acid treatment in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 24, 3358-3368.
- Meier, P., and Vousden, K. H. (2007). Lucifer's labyrinth--ten years of path finding in cell death. *Mol Cell* 28, 746-754.
- Melino, G., Thiele, C. J., Knight, R. A., and Piacentini, M. (1997). Retinoids and the control of growth/death decisions in human neuroblastoma cell lines. *J Neurooncol* 31, 65-83.
- Mendelsohn, C., Larkin, S., Mark, M., LeMeur, M., Clifford, J., Zelent, A., and Chambon, P. (1994). RAR beta isoforms: distinct transcriptional control by retinoic acid and specific spatial patterns of promoter activity during mouse embryonic development. *Mech Dev* 45, 227-241.
- Meseguer, S., Mudduluru, G., Escamilla, J. M., Allgayer, H., and Baretino, D. (2011). MicroRNAs-10a and -10b contribute to retinoic acid-induced differentiation of neuroblastoma cells and target the alternative splicing regulatory factor SFRS1 (SF2/ASF). *J Biol Chem* 286, 4150-4164.

- Metivier, R., Penot, G., Flouriot, G., and Pakdel, F. (2001). Synergism between ERalpha transactivation function 1 (AF-1) and AF-2 mediated by steroid receptor coactivator protein-1: requirement for the AF-1 alpha-helical core and for a direct interaction between the N- and C-terminal domains. *Mol Endocrinol* 15, 1953-1970.
- Meylan, E., and Tschopp, J. (2006). Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses. *Mol Cell* 22, 561-569.
- Meylan, E., Tschopp, J., and Karin, M. (2006). Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 442, 39-44.
- Meyskens, F. L., Jr., Surwit, E., Moon, T. E., Childers, J. M., Davis, J. R., Dorr, R. T., Johnson, C. S., and Alberts, D. S. (1994). Enhancement of regression of cervical intraepithelial neoplasia II (moderate dysplasia) with topically applied all-trans-retinoic acid: a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 86, 539-543.
- Micheau, O., and Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114, 181-190.
- Mira, Y. L. R., Zheng, W. L., Kuppumbatti, Y. S., Rexer, B., Jing, Y., and Ong, D. E. (2000). Retinol conversion to retinoic acid is impaired in breast cancer cell lines relative to normal cells. *J Cell Physiol* 185, 302-309.
- Mongan, N. P., and Gudas, L. J. (2007). Diverse actions of retinoid receptors in cancer prevention and treatment. *Differentiation* 75, 853-870.
- Montano, M. M., Muller, V., Trobaugh, A., and Katzenellenbogen, B. S. (1995). The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol Endocrinol* 9, 814-825.
- Morey, L., Brenner, C., Fazi, F., Villa, R., Gutierrez, A., Buschbeck, M., Nervi, C., Minucci, S., Fuks, F., and Di Croce, L. (2008). MBD3, a component of the NuRD complex, facilitates chromatin alteration and deposition of epigenetic marks. *Mol Cell Biol* 28, 5912-5923.
- Morrison, B. H., Tang, Z., Jacobs, B. S., Bauer, J. A., and Lindner, D. J. (2005). Apo2L/TRAIL induction and nuclear translocation of inositol hexakisphosphate kinase 2 during IFN-beta-induced apoptosis in ovarian carcinoma. *Biochem J* 385, 595-603.
- Mrass, P., Rendl, M., Mildner, M., Gruber, F., Lengauer, B., Ballaun, C., Eckhart, L., and Tschachler, E. (2004). Retinoic acid increases the expression of p53 and proapoptotic caspases and sensitizes keratinocytes to apoptosis: a possible explanation for tumor preventive action of retinoids. *Cancer Res* 64, 6542-6548.
- Mundt, B., Kuhnel, F., Zender, L., Paul, Y., Tillmann, H., Trautwein, C., Manns, M. P., and Kubicka, S. (2003). Involvement of TRAIL and its receptors in viral hepatitis. *FASEB J* 17, 94-96.
- Musto, P., Sajeve, M. R., Sanpaolo, G., D'Arena, G., Scalzulli, P. R., and Carotenuto, M. (1997). All-trans retinoic acid in combination with alpha-interferon and dexamethasone for advanced multiple myeloma. *Haematologica* 82, 354-356.
- Muto, Y., Moriwaki, H., Ninomiya, M., Adachi, S., Saito, A., Takasaki, K. T., Tanaka, T., Tsurumi, K., Okuno, M., Tomita, E., *et al.* (1996). Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid, polyprenoic acid, in patients with hepatocellular carcinoma. Hepatoma Prevention Study Group. *N Engl J Med* 334, 1561-1567.
- Na, S. Y., Kang, B. Y., Chung, S. W., Han, S. J., Ma, X., Trinchieri, G., Im, S. Y., Lee, J. W., and Kim, T. S. (1999). Retinoids inhibit interleukin-12 production in macrophages through physical associations of retinoid X receptor and NFkappaB. *J Biol Chem* 274, 7674-7680.
- Nagpal, S., Friant, S., Nakshatri, H., and Chambon, P. (1993). RARs and RXRs: evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization in vivo. *EMBO J* 12, 2349-2360.

- Nagy, L., Thomazy, V. A., Shipley, G. L., Fesus, L., Lamph, W., Heyman, R. A., Chandraratna, R. A., and Davies, P. J. (1995). Activation of retinoid X receptors induces apoptosis in HL-60 cell lines. *Mol Cell Biol* 15, 3540-3551.
- Nicodemus, C. F., Wang, L., Lucas, J., Varghese, B., and Berek, J. S. (2010). Toll-like receptor-3 as a target to enhance bioactivity of cancer immunotherapy. *Am J Obstet Gynecol* 202, 608 e601-608.
- Niederreither, K., Subbarayan, V., Dolle, P., and Chambon, P. (1999). Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat Genet* 21, 444-448.
- Niizuma, H., Nakamura, Y., Ozaki, T., Nakanishi, H., Ohira, M., Isogai, E., Kageyama, H., Imaizumi, M., and Nakagawara, A. (2006). Bcl-2 is a key regulator for the retinoic acid-induced apoptotic cell death in neuroblastoma. *Oncogene* 25, 5046-5055.
- Niles, R. M. (2004). Signaling pathways in retinoid chemoprevention and treatment of cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 555, 97-105.
- Nimmanapalli, R., Porosnicu, M., Nguyen, D., Worthington, E., O'Bryan, E., Perkins, C., and Bhalla, K. (2001). Cotreatment with STI-571 enhances tumor necrosis factor alpha-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL or apo-2L)-induced apoptosis of Bcr-Abl-positive human acute leukemia cells. *Clin Cancer Res* 7, 350-357.
- Niu, M. Y., Menard, M., Reed, J. C., Krajewski, S., and Pratt, M. A. (2001). Ectopic expression of cyclin D1 amplifies a retinoic acid-induced mitochondrial death pathway in breast cancer cells. *Oncogene* 20, 3506-3518.
- Obora, A., Shiratori, Y., Okuno, M., Adachi, S., Takano, Y., Matsushima-Nishiwaki, R., Yasuda, I., Yamada, Y., Akita, K., Sano, T., *et al.* (2002). Synergistic induction of apoptosis by acyclic retinoid and interferon-beta in human hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 36, 1115-1124.
- Okahira, S., Nishikawa, F., Nishikawa, S., Akazawa, T., Seya, T., and Matsumoto, M. (2005). Interferon-beta induction through toll-like receptor 3 depends on double-stranded RNA structure. *DNA Cell Biol* 24, 614-623.
- Ortiz, M. A., Bayon, Y., Lopez-Hernandez, F. J., and Piedrafita, F. J. (2002). Retinoids in combination therapies for the treatment of cancer: mechanisms and perspectives. *Drug Resist Updat* 5, 162-175.
- Osanai, M., Sawada, N., and Lee, G. H. (2010). Oncogenic and cell survival properties of the retinoic acid metabolizing enzyme, CYP26A1. *Oncogene* 29, 1135-1144.
- Pan, G., Ni, J., Wei, Y. F., Yu, G., Gentz, R., and Dixit, V. M. (1997a). An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 277, 815-818.
- Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A. M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J., and Dixit, V. M. (1997b). The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276, 111-113.
- Panter, G., Kuznik, A., and Jerala, R. (2009). Therapeutic applications of nucleic acids as ligands for Toll-like receptors. *Curr Opin Mol Ther* 11, 133-145.
- Paone, A., Starace, D., Galli, R., Padula, F., De Cesaris, P., Filippini, A., Ziparo, E., and Riccioli, A. (2008). Toll-like receptor 3 triggers apoptosis of human prostate cancer cells through a PKC-alpha-dependent mechanism. *Carcinogenesis* 29, 1334-1342.
- Parmar, S., and Platanias, L. C. (2003). Interferons: mechanisms of action and clinical applications. *Curr Opin Oncol* 15, 431-439.
- Peck, G. L. (1986). Topical tretinoin in actinic keratosis and basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 15, 829-835.
- Pellicano, L., Li, F., Schindler, C., and Chelbi-Alix, M. K. (1997). Retinoic acid enhances the expression of interferon-induced proteins: evidence for multiple mechanisms of action. *Oncogene* 15, 2349-2359.

- Percario, Z. A., Giandomenico, V., Fiorucci, G., Chiantore, M. V., Vannucchi, S., Hiscott, J., Affabris, E., and Romeo, G. (1999). Retinoic acid is able to induce interferon regulatory factor 1 in squamous carcinoma cells via a STAT-1 independent signalling pathway. *Cell Growth Differ* 10, 263-270.
- Pestka, S., Krause, C. D., and Walter, M. R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 202, 8-32.
- Petersen, S. L., Wang, L., Yalcin-Chin, A., Li, L., Peyton, M., Minna, J., Harran, P., and Wang, X. (2007). Autocrine TNFalpha signaling renders human cancer cells susceptible to Smac-mimetic-induced apoptosis. *Cancer Cell* 12, 445-456.
- Petkovich, M., Brand, N. J., Krust, A., and Chambon, P. (1987). A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 330, 444-450.
- Pissios, P., Tzameli, I., Kushner, P., and Moore, D. D. (2000). Dynamic stabilization of nuclear receptor ligand binding domains by hormone or corepressor binding. *Mol Cell* 6, 245-253.
- Pozzi, S., Rossetti, S., Bistulfi, G., and Sacchi, N. (2006). RAR-mediated epigenetic control of the cytochrome P450 Cyp26a1 in embryocarcinoma cells. *Oncogene* 25, 1400-1407.
- Pratt, M. A., Niu, M., and White, D. (2003). Differential regulation of protein expression, growth and apoptosis by natural and synthetic retinoids. *J Cell Biochem* 90, 692-708.
- Rajput, A., Kovalenko, A., Bogdanov, K., Yang, S. H., Kang, T. B., Kim, J. C., Du, J., and Wallach, D. (2011). RIG-I RNA helicase activation of IRF3 transcription factor is negatively regulated by caspase-8-mediated cleavage of the RIP1 protein. *Immunity* 34, 340-351.
- Rasschaert, J., Ladriere, L., Urbain, M., Dogusan, Z., Katabua, B., Sato, S., Akira, S., Gysemans, C., Mathieu, C., and Eizirik, D. L. (2005). Toll-like receptor 3 and STAT-1 contribute to double-stranded RNA+ interferon-gamma-induced apoptosis in primary pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 280, 33984-33991.
- Recchia, F., Sica, G., Candeloro, G., Necozone, S., Bisegna, R., Bratta, M., and Rea, S. (2009). Beta-interferon, retinoids and tamoxifen in metastatic breast cancer: long-term follow-up of a phase II study. *Oncol Rep* 21, 1011-1016.
- Reynolds, C. P., Matthay, K. K., Villablanca, J. G., and Maurer, B. J. (2003). Retinoid therapy of high-risk neuroblastoma. *Cancer Lett* 197, 185-192.
- Ricci, M. S., Kim, S. H., Ogi, K., Plataras, J. P., Ling, J., Wang, W., Jin, Z., Liu, Y. Y., Dicker, D. T., Chiao, P. J., *et al.* (2007). Reduction of TRAIL-induced Mcl-1 and cIAP2 by c-Myc or sorafenib sensitizes resistant human cancer cells to TRAIL-induced death. *Cancer Cell* 12, 66-80.
- Riedl, S. J., and Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 897-907.
- Rigas, J. R., and Dragnev, K. H. (2005). Emerging role of rexinoids in non-small cell lung cancer: focus on bexarotene. *Oncologist* 10, 22-33.
- Rochette-Egly, C. (2003). Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cell Signal* 15, 355-366.
- Romert, A., Tuvendal, P., Simon, A., Dencker, L., and Eriksson, U. (1998). The identification of a 9-cis retinol dehydrogenase in the mouse embryo reveals a pathway for synthesis of 9-cis retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4404-4409.
- Ross-Innes, C. S., Stark, R., Holmes, K. A., Schmidt, D., Spyrou, C., Russell, R., Massie, C. E., Vowler, S. L., Eldridge, M., and Carroll, J. S. (2010). Cooperative interaction between retinoic acid receptor-alpha and estrogen receptor in breast cancer. *Genes Dev* 24, 171-182.

- Roth, W., and Reed, J. C. (2004). FLIP protein and TRAIL-induced apoptosis. *Vitam Horm* 67, 189-206.
- Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 16, 6914-6925.
- Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G., and Vandenabeele, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23, 2861-2874.
- Saffiotti, U., Montesano, R., Sellakumar, A. R., and Borg, S. A. (1967). Experimental cancer of the lung. Inhibition by vitamin A of the induction of tracheobronchial squamous metaplasia and squamous cell tumors. *Cancer* 20, 857-864.
- Salaun, B., Coste, I., Rissoan, M. C., Lebecque, S. J., and Renno, T. (2006). TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *J Immunol* 176, 4894-4901.
- Salaun, B., Lebecque, S., Matikainen, S., Rimoldi, D., and Romero, P. (2007a). Toll-like receptor 3 expressed by melanoma cells as a target for therapy? *Clin Cancer Res* 13, 4565-4574.
- Salaun, B., Romero, P., and Lebecque, S. (2007b). Toll-like receptors' two-edged sword: when immunity meets apoptosis. *Eur J Immunol* 37, 3311-3318.
- Salaun, B., Zitvogel, L., Asselin-Paturel, C., Morel, Y., Chemin, K., Dubois, C., Massacrier, C., Conforti, R., Chenard, M. P., Sabourin, J. C., *et al.* (2011). TLR3 as a biomarker for the therapeutic efficacy of double-stranded RNA in breast cancer. *Cancer Res* 71, 1607-1614.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 17, 1675-1687.
- Schule, R., Rangarajan, P., Yang, N., Kliwer, S., Ransone, L. J., Bolado, J., Verma, I. M., and Evans, R. M. (1991). Retinoic acid is a negative regulator of AP-1-responsive genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 6092-6096.
- Sedger, L. M., Shows, D. M., Blanton, R. A., Peschon, J. J., Goodwin, R. G., Cosman, D., and Wiley, S. R. (1999). IFN-gamma mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression. *J Immunol* 163, 920-926.
- Seewaldt, V. L., Johnson, B. S., Parker, M. B., Collins, S. J., and Swisshelm, K. (1995). Expression of retinoic acid receptor beta mediates retinoic acid-induced growth arrest and apoptosis in breast cancer cells. *Cell Growth Differ* 6, 1077-1088.
- Shemshedini, L., Knauth, R., Sassone-Corsi, P., Pornon, A., and Gronemeyer, H. (1991). Cell-specific inhibitory and stimulatory effects of Fos and Jun on transcription activation by nuclear receptors. *EMBO J* 10, 3839-3849.
- Shin, D. M., Glisson, B. S., Khuri, F. R., Clifford, J. L., Clayman, G., Benner, S. E., Forastiere, A. A., Ginsberg, L., Liu, D., Lee, J. J., *et al.* (2002). Phase II and biologic study of interferon alfa, retinoic acid, and cisplatin in advanced squamous skin cancer. *J Clin Oncol* 20, 364-370.
- Shyu, R. Y., Chang, S. C., Yu, J. C., Hsu, S. J., Chou, J. M., Lee, M. S., and Jiang, S. Y. (2005). Expression and regulation of retinoid-inducible gene 1 (RIG1) in breast cancer. *Anticancer Res* 25, 2453-2460.
- Shyu, R. Y., Lin, D. Y., Reichert, U., and Jiang, S. Y. (2002). Synthetic retinoid CD437 induces cell-dependent cycle arrest by differential regulation of cell cycle associated proteins. *Anticancer Res* 22, 2757-2764.
- Sidell, N. (1982). Retinoic acid-induced growth inhibition and morphologic differentiation of human neuroblastoma cells in vitro. *J Natl Cancer Inst* 68, 589-596.
- Simoncini, T., Maffei, S., Basta, G., Barsacchi, G., Genazzani, A. R., Liao, J. K., and De Caterina, R. (2000). Estrogens and glucocorticoids inhibit endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by different transcriptional mechanisms. *Circ Res* 87, 19-25.

- Sirchia, S. M., Ferguson, A. T., Sironi, E., Subramanyan, S., Orlandi, R., Sukumar, S., and Sacchi, N. (2000). Evidence of epigenetic changes affecting the chromatin state of the retinoic acid receptor beta2 promoter in breast cancer cells. *Oncogene* 19, 1556-1563.
- Sirchia, S. M., Ren, M., Pili, R., Sironi, E., Somenzi, G., Ghidoni, R., Toma, S., Nicolo, G., and Sacchi, N. (2002). Endogenous reactivation of the RARbeta2 tumor suppressor gene epigenetically silenced in breast cancer. *Cancer Res* 62, 2455-2461.
- Smits, E. L., Ponsaerts, P., Van de Velde, A. L., Van Driessche, A., Cools, N., Lenjou, M., Nijs, G., Van Bockstaele, D. R., Berneman, Z. N., and Van Tendeloo, V. F. (2007). Proinflammatory response of human leukemic cells to dsRNA transfection linked to activation of dendritic cells. *Leukemia* 21, 1691-1699.
- Smyth, M. J., Takeda, K., Hayakawa, Y., Peschon, J. J., van den Brink, M. R., and Yagita, H. (2003). Nature's TRAIL--on a path to cancer immunotherapy. *Immunity* 18, 1-6.
- Solomin, L., Johansson, C. B., Zetterstrom, R. H., Bissonnette, R. P., Heyman, R. A., Olson, L., Lendahl, U., Frisen, J., and Perlmann, T. (1998). Retinoid-X receptor signalling in the developing spinal cord. *Nature* 395, 398-402.
- Somos, S., and Farkas, B. (2000). Immunomodulatory treatment with low-dose interferon-alpha and oral retinoic acid in lymphangioma-like Kaposi's sarcoma. *Anticancer Res* 20, 541-545.
- Sonoda, J., Pei, L., and Evans, R. M. (2008). Nuclear receptors: Decoding metabolic disease. *FEBS Letters* 582, 2-9.
- Soprano, D. R., Qin, P., and Soprano, K. J. (2004). Retinoic acid receptors and cancers. *Annu Rev Nutr* 24, 201-221.
- Spanjaard, R. A., Ikeda, M., Lee, P. J., Charpentier, B., Chin, W. W., and Eberlein, T. J. (1997). Specific activation of retinoic acid receptors (RARs) and retinoid X receptors reveals a unique role for RARgamma in induction of differentiation and apoptosis of S91 melanoma cells. *J Biol Chem* 272, 18990-18999.
- Sporn, M. B., Roberts, A. B., and Goodman, D. S. (1994). *The retinoids: Biology, chemistry and medicine* (New York, Raven Press).
- Sprick, M. R., Weigand, M. A., Rieser, E., Rauch, C. T., Juo, P., Blenis, J., Krammer, P. H., and Walczak, H. (2000). FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* 12, 599-609.
- Sucov, H. M., and Evans, R. M. (1995). Retinoic acid and retinoic acid receptors in development. *Mol Neurobiol* 10, 169-184.
- Sun, R., Zhang, Y., Lv, Q., Liu, B., Jin, M., Zhang, W., He, Q., Deng, M., Liu, X., Li, G., *et al.* (2011). Toll-like receptor 3 (TLR3) induces apoptosis via death receptors and mitochondria by up-regulating the transactivating p63 isoform alpha (TAP63alpha). *J Biol Chem* 286, 15918-15928.
- Sun, S. Y., Kurie, J. M., Yue, P., Dawson, M. I., Shroot, B., Chandraratna, R. A., Hong, W. K., and Lotan, R. (1999). Differential responses of normal, premalignant, and malignant human bronchial epithelial cells to receptor-selective retinoids. *Clin Cancer Res* 5, 431-437.
- Sun, S. Y., and Lotan, R. (2002). Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. *Crit Rev Oncol Hematol* 41, 41-55.
- Suzui, M., Shimizu, M., Masuda, M., Lim, J. T., Yoshimi, N., and Weinstein, I. B. (2004). Acyclic retinoid activates retinoic acid receptor beta and induces transcriptional activation of p21(CIP1) in HepG2 human hepatoma cells. *Mol Cancer Ther* 3, 309-316.

- Szanto, A., Benko, S., Szatmari, I., Balint, B. L., Furtos, I., Ruhl, R., Molnar, S., Csiba, L., Garuti, R., Calandra, S., *et al.* (2004). Transcriptional regulation of human CYP27 integrates retinoid, peroxisome proliferator-activated receptor, and liver X receptor signaling in macrophages. *Mol Cell Biol* 24, 8154-8166.
- Takai, K., Okuno, M., Yasuda, I., Matsushima-Nishiwaki, R., Uematsu, T., Tsurumi, H., Shiratori, Y., Muto, Y., and Moriawaki, H. (2005). Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid in patients with hepatocellular carcinoma. Updated analysis of the long-term follow-up data. *Intervirolgy* 48, 39-45.
- Takaoka, A., Hayakawa, S., Yanai, H., Stoiber, D., Negishi, H., Kikuchi, H., Sasaki, S., Imai, K., Shibue, T., Honda, K., and Taniguchi, T. (2003). Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature* 424, 516-523.
- Takeda, K., and Akira, S. (2004). TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 16, 3-9.
- Takeda, K., Cretney, E., Hayakawa, Y., Ota, T., Akiba, H., Ogasawara, K., Yagita, H., Kinoshita, K., Okumura, K., and Smyth, M. J. (2005). TRAIL identifies immature natural killer cells in newborn mice and adult mouse liver. *Blood* 105, 2082-2089.
- Takeda, K., Hayakawa, Y., Smyth, M. J., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Kakuta, S., Iwakura, Y., Yagita, H., and Okumura, K. (2001). Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat Med* 7, 94-100.
- Takeda, K., Smyth, M. J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Kayagaki, N., Yagita, H., and Okumura, K. (2002). Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J Exp Med* 195, 161-169.
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805-820.
- Tanaka, K., Iwamoto, S., Gon, G., Nohara, T., Iwamoto, M., and Tanigawa, N. (2000). Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 6, 127-134.
- Tenev, T., Bianchi, K., Darding, M., Broemer, M., Langlais, C., Wallberg, F., Zachariou, A., Lopez, J., MacFarlane, M., Cain, K., and Meier, P. (2011). The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs. *Mol Cell* 43, 432-448.
- Thin, T. H., Li, L., Chung, T. K., Sun, H., and Taneja, R. (2007). Stra13 is induced by genotoxic stress and regulates ionizing-radiation-induced apoptosis. *EMBO Rep* 8, 401-407.
- Tinel, A., and Tschopp, J. (2004). The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* 304, 843-846.
- Tong, Q. S., Zheng, L. D., Wang, L., Zeng, F. Q., Chen, F. M., Dong, J. H., and Lu, G. C. (2005). Downregulation of XIAP expression induces apoptosis and enhances chemotherapeutic sensitivity in human gastric cancer cells. *Cancer Gene Ther* 12, 509-514.
- Touma, S. E., Perner, S., Rubin, M. A., Nanus, D. M., and Gudas, L. J. (2009). Retinoid metabolism and ALDH1A2 (RALDH2) expression are altered in the transgenic adenocarcinoma mouse prostate model. *Biochem Pharmacol* 78, 1127-1138.
- Tsao, A. S., Kim, E. S., and Hong, W. K. (2004). Chemoprevention of cancer. *CA Cancer J Clin* 54, 150-180.
- Tsimberidou, A. M., Giles, F., Romaguera, J., Duvic, M., and Kurzrock, R. (2004). Activity of interferon-alpha and isotretinoin in patients with advanced, refractory lymphoid malignancies. *Cancer* 100, 574-580.
- Um, S. J., Kim, E. J., Hwang, E. S., Kim, S. J., Namkoong, S. E., and Park, J. S. (2000). Antiproliferative effects of retinoic acid/interferon in cervical carcinoma cell lines: cooperative growth suppression of IRF-1 and p53. *Int J Cancer* 85, 416-423.

- Umesono, K., Murakami, K. K., Thompson, C. C., and Evans, R. M. (1991). Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* 65, 1255-1266.
- Vandenabeele, P., Declercq, W., Van Herreweghe, F., and Vanden Berghe, T. (2010). The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis. *Sci Signal* 3, re4.
- Varfolomeev, E., Blankenship, J. W., Wayson, S. M., Fedorova, A. V., Kayagaki, N., Garg, P., Zobel, K., Dynek, J. N., Elliott, L. O., Wallweber, H. J., *et al.* (2007). IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* 131, 669-681.
- Vasilevskaya, I. A., and O'Dwyer, P. J. (2005). 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin overcomes TRAIL resistance in colon cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 70, 580-589.
- Vercammen, E., Staal, J., and Beyaert, R. (2008a). Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3. *Clin Microbiol Rev* 21, 13-25.
- Vercammen, E., Staal, J., Van Den Broeke, A., Haegman, M., Vereecke, L., Schotte, P., and Beyaert, R. (2008b). Prolonged exposure to IL-1beta and IFNgamma induces necrosis of L929 tumor cells via a p38MAPK/NF-kappaB/NO-dependent mechanism. *Oncogene* 27, 3780-3788.
- Veronesi, U., De Palo, G., Marubini, E., Costa, A., Formelli, F., Mariani, L., Decensi, A., Camerini, T., Del Turco, M. R., Di Mauro, M. G., *et al.* (1999). Randomized trial of fenretinide to prevent second breast malignancy in women with early breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 91, 1847-1856.
- Vertuani, S., De Geer, A., Levitsky, V., Kogner, P., Kiessling, R., and Levitskaya, J. (2003). Retinoids act as multistep modulators of the major histocompatibility class I presentation pathway and sensitize neuroblastomas to cytotoxic lymphocytes. *Cancer Res* 63, 8006-8013.
- Villa, R., Morey, L., Raker, V. A., Buschbeck, M., Gutierrez, A., De Santis, F., Corsaro, M., Varas, F., Bossi, D., Minucci, S., *et al.* (2006). The methyl-CpG binding protein MBD1 is required for PML-RARalpha function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1400-1405.
- Vince, J. E., Wong, W. W., Khan, N., Feltham, R., Chau, D., Ahmed, A. U., Benetatos, C. A., Chunduru, S. K., Condon, S. M., McKinlay, M., *et al.* (2007). IAP antagonists target cIAP1 to induce TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* 131, 682-693.
- Vivat-Hannah, V., You, D., Rizzo, C., Daris, J. P., Lapointe, P., Zusi, F. C., Marinier, A., Lorenzi, M. V., and Gottardis, M. M. (2001). Synergistic cytotoxicity exhibited by combination treatment of selective retinoid ligands with taxol (Paclitaxel). *Cancer Res* 61, 8703-8711.
- Walczak, H., Miller, R. E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T. S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., *et al.* (1999). Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med* 5, 157-163.
- Wallden, B., Emond, M., Swift, M. E., Disis, M. L., and Swisshelm, K. (2005). Antimetastatic gene expression profiles mediated by retinoic acid receptor beta 2 in MDA-MB-435 breast cancer cells. *BMC Cancer* 5, 140.
- Wan, H., Oridate, N., Lotan, D., Hong, W. K., and Lotan, R. (1999). Overexpression of retinoic acid receptor beta in head and neck squamous cell carcinoma cells increases their sensitivity to retinoid-induced suppression of squamous differentiation by retinoids. *Cancer Res* 59, 3518-3526.
- Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V., and Baldwin, A. S., Jr. (1998). NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281, 1680-1683.
- Wang, L., Du, F., and Wang, X. (2008). TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* 133, 693-703.
- Wang, S., and El-Deiry, W. S. (2003). TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene* 22, 8628-8633.

- Wang, X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15, 2922-2933.
- Weber, A., Kirejczyk, Z., Besch, R., Potthoff, S., Leverkus, M., and Hacker, G. (2010). Proapoptotic signalling through Toll-like receptor-3 involves TRIF-dependent activation of caspase-8 and is under the control of inhibitor of apoptosis proteins in melanoma cells. *Cell Death Differ* 17, 942-951.
- Wheelock, E. F. (1965). Interferon-Like Virus-Inhibitor Induced in Human Leukocytes by Phytohemagglutinin. *Science* 149, 310-311.
- Widschwendter, M., Berger, J., Daxenbichler, G., Muller-Holzner, E., Widschwendter, A., Mayr, A., Marth, C., and Zeimet, A. G. (1997a). Loss of retinoic acid receptor beta expression in breast cancer and morphologically normal adjacent tissue but not in the normal breast tissue distant from the cancer. *Cancer Res* 57, 4158-4161.
- Widschwendter, M., Berger, J., Muller, H. M., Zeimet, A. G., and Marth, C. (2001). Epigenetic downregulation of the retinoic acid receptor-beta2 gene in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6, 193-201.
- Widschwendter, M., Daxenbichler, G., Bachmair, F., Muller, E., Zeimet, A. G., Windbichler, G., Uhl-Steidl, M., Lang, T., and Marth, C. (1996). Interaction of retinoic acid and interferon-alpha in breast cancer cell lines. *Anticancer Res* 16, 369-374.
- Widschwendter, M., Daxenbichler, G., Culig, Z., Michel, S., Zeimet, A. G., Mortl, M. G., Widschwendter, A., and Marth, C. (1997b). Activity of retinoic acid receptor-gamma selectively binding retinoids alone and in combination with interferon-gamma in breast cancer cell lines. *Int J Cancer* 71, 497-504.
- Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C. P., Nicholl, J. K., Sutherland, G. R., Smith, T. D., Rauch, C., Smith, C. A., and et al. (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3, 673-682.
- Witcher, M., Ross, D. T., Rousseau, C., Deluca, L., and Miller, W. H., Jr. (2003). Synergy between all-trans retinoic acid and tumor necrosis factor pathways in acute leukemia cells. *Blood* 102, 237-245.
- Wolbach, S. B., and Howe, P. R. (1925). Tissue Changes Following Deprivation of Fat-Soluble a Vitamin. *J Exp Med* 42, 753-777.
- Xu, X. C., Sneige, N., Liu, X., Nandagiri, R., Lee, J. J., Lukmanji, F., Hortobagyi, G., Lippman, S. M., Dhingra, K., and Lotan, R. (1997a). Progressive decrease in nuclear retinoic acid receptor beta messenger RNA level during breast carcinogenesis. *Cancer Res* 57, 4992-4996.
- Xu, X. C., Sozzi, G., Lee, J. S., Lee, J. J., Pastorino, U., Pilotti, S., Kurie, J. M., Hong, W. K., and Lotan, R. (1997b). Suppression of retinoic acid receptor beta in non-small-cell lung cancer in vivo: implications for lung cancer development. *J Natl Cancer Inst* 89, 624-629.
- Yagita, H., Takeda, K., Hayakawa, Y., Smyth, M. J., and Okumura, K. (2004). TRAIL and its receptors as targets for cancer therapy. *Cancer Sci* 95, 777-783.
- Yang, Q., Shan, L., Yoshimura, G., Nakamura, M., Nakamura, Y., Suzuma, T., Umemura, T., Mori, I., Sakurai, T., and Kakudo, K. (2002). 5-aza-2'-deoxycytidine induces retinoic acid receptor beta 2 demethylation, cell cycle arrest and growth inhibition in breast carcinoma cells. *Anticancer Res* 22, 2753-2756.
- Yoneda, K., Sugimoto, K., Shiraki, K., Tanaka, J., Beppu, T., Fuke, H., Yamamoto, N., Masuya, M., Horie, R., Uchida, K., and Takei, Y. (2008). Dual topology of functional Toll-like receptor 3 expression in human hepatocellular carcinoma: differential signaling mechanisms of TLR3-induced NF-kappaB activation and apoptosis. *Int J Oncol* 33, 929-936.
- Yoneyama, M., and Fujita, T. (2007). RIG-I family RNA helicases: cytoplasmic sensor for antiviral innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 18, 545-551.

- Youssef, E. M., Issa, J. P., and Lotan, R. (2004). Regulation of RARbeta1 expression in head and neck cancer cells by cell density-dependent chromatin remodeling. *Cancer Biol Ther* 3, 1002-1006.
- Zhang, C., and Duvic, M. (2003). Retinoids: therapeutic applications and mechanisms of action in cutaneous T-cell lymphoma. *Dermatol Ther* 16, 322-330.
- Zhang, H., and Rosdahl, I. (2004). Expression profiles of p53, p21, bax and bcl-2 proteins in all-trans-retinoic acid treated primary and metastatic melanoma cells. *Int J Oncol* 25, 303-308.
- Zhang, R., Banik, N. L., and Ray, S. K. (2008). Combination of all-trans retinoic acid and interferon-gamma upregulated p27(kip1) and down regulated CDK2 to cause cell cycle arrest leading to differentiation and apoptosis in human glioblastoma LN18 (PTEN-proficient) and U87MG (PTEN-deficient) cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 62, 407-416.
- Zhang, X. D., Gillespie, S. K., Borrow, J. M., and Hersey, P. (2003). The histone deacetylase inhibitor suberic bishydroxamate: a potential sensitizer of melanoma to TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induced apoptosis. *Biochem Pharmacol* 66, 1537-1545.
- Zheng, A., Mantymaa, P., Saily, M., Savolainen, E., Vahakangas, K., and Koistinen, P. (2000). p53 pathway in apoptosis induced by all-trans-retinoic acid in acute myeloblastic leukaemia cells. *Acta Haematol* 103, 135-143.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X., and Wang, X. (1999). An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274, 11549-11556.